

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie  
Westdeutsches Tumorzentrum  
und dem  
Department of Medical Oncology  
Dana Farber Cancer Institute

**Quantitative und qualitative Unterschiede in der Immunrekonstitution  
nach allogener Stammzelltransplantation: Vergleich von Stammzellen aus  
Nabelschnurblut und solchen aus peripherem Blut bei erwachsenen  
Patienten mit hämatologischen Erkrankungen.**

## **Inaugural – Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Amin Taha Turki  
aus Recklinghausen

2012

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Priv.-Doz. Dr. med. J. Novotny
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. H. Wilke
3. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. G. Kobbe, Düsseldorf
Tag der mündlichen Prüfung:	2. Dezember 2013

**Jacobson CA, Turki AT, et al.** Immune Reconstitution after Double Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation: Comparison with Unrelated Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(4):565-74; Epub 2011 Aug 26.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

1.1	Die allogene Stammzelltransplantation	6
1.1.1	Identifikation eines passenden Spenders	7
1.1.2	Transplantations-assoziierte Komplikationen	8
1.1.3	Die nachhaltige Eliminierung der vorliegenden malignen Krankheit	9
1.2	Die Nabelschnurbluttransplantation (UCBT) bei Kindern und Erwachsenen	11
1.2.1	Die Evidenzproblematik der allogenen Stammzelltransplantation	14
1.2.2	Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation	15
1.3	Die Fragestellung dieser Arbeit	17

### **2. Material und Methoden**

2.1	Patienten	18
2.2	Durchflusszytometrie peripherer Blutzellen	18
2.3	Serum Immunoglobulin Level	19
2.4	HLA Typisierung	19
2.5	Analysen des molekularen Chimerismus	20
2.6	Statistische Analyse	20

### **3. Ergebnisse**

3.1	Klinische Charakteristika der Patientengruppen	22
3.2	Chimerismusanalysen	26
3.3	Rekonstitution der T Zellen und ihrer Untergruppen	29
3.4	Rekonstitution von T Zell Subgruppen	32
3.5	Rekonstitution der B Zell- und der NK Zellreihen	36
3.6	Dendritische Zellen	38
3.7	Immunglobulinlevel nach Stammzelltransplantation	39

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Immunrekonstitution	42
4.2	GVHD	47
4.3	Immunoregulatorische Komponenten: Tregs, Bregs und NK Zellen	48
4.3.1	Tregs	48
4.3.2	Bregs	49
4.3.3	NK Zellen	50
4.4	Antitumoreffekte der B Zellen	51
4.5	Qualitative Unterschiede in der Immunrekonstitution	51
4.6	Klinische Relevanz der Immunrekonstitution	53
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>65</b>
7.1	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	65
7.2	Abkürzungsverzeichnis	66
7.3	Danksagung	68
7.4	Lebenslauf	69

## 1. Einleitung

### 1.1 Die allogene Stammzelltransplantation

Die Methode der allogenen hämatologischen Stammzelltransplantation wurde in den letzten zwei Jahrzehnten immer häufiger eingesetzt und ist heutzutage als Standardtherapie bei Hochrisikoformen hämatologischer Erkrankungen etabliert. Dabei werden neben hämatologischen Erkrankungen auch solide Tumore, Immundefizienzsyndrome, die Aplastische Anämie, Hämoglobinämien und Enzymdefekte behandelt.

Das biologische Ziel einer Stammzelltransplantation besteht darin, eine Radio- oder Chemotherapie zu verabreichen, welche die malignen Zellen des Patienten vernichten soll. Dabei werden die malignen und blutbildenden Zellen des Empfängers durch eine Hochdosistherapie (alternativ bei fortgeschrittenem Alter: reduzierte Dosis) zerstört und es wird eine Nische für die konsekutiv applizierten Stammzellen eines allogenen Spenders geschaffen. Im Falle einer Konditionierungstherapie mit reduzierter Intensität ist der allogene graft-versus-tumor Effekt deutlicher akzentuiert. Die allogenen CD34+ Stammzellen ersetzen das beschädigte Gewebe aus lymphoiden- oder myeloiden Progenitorzellen. Die Einwanderung aus der Peripherie in das Knochenmark (*homing*) wird durch das Chemokinprofil der Stammzellen und des Knochenmarks determiniert. Der Erfolg lässt sich in einer Recovery der neutrophilen Granulozyten sowie der Thrombozyten messen.

Weiterhin ist es entscheidend für das Überleben des Patienten, Toleranzmechanismen zu aktivieren, damit weder die Stammzellen des Spenders abgestoßen werden (*graft rejection*) noch sich eine Abstoßungsreaktion gegen die Organe des Patienten (*graft versus host reaction* oder *graft versus host disease GvHD*) entwickelt. Dabei muss trotz der bestehenden Immunsuppression dennoch der allogene Spendereffekt (graft versus tumor, GVT oder graft versus leukemia, GVL) bewahrt werden, damit die Elimination der malignen Tumorzellen vervollständigt werden kann. Denn eine Hochdosistherapie ohne allogenen Effekt würde bei den hier beschriebenen Erkrankungen keine Heilung erzielen lassen.

Es gibt drei Aspekte, welche eine erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation ausmachen: 1. Die Identifikation eines passenden Spenders 2. Die Prävention und effektive Behandlung der transplantations-assoziierten Komplikationen 3. Die nachhaltige Eliminierung der vorliegenden malignen Krankheit.

### **1.1.1 Identifikation eines passenden Spenders**

Wenn für einen Patienten eine allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen wird, muss in der Regel ein HLA kompatibler Spender gefunden werden. Häufig geschieht dies in der nahen Verwandtschaft. In anderen Fällen wird eine Fremdspendersuche von einem anonymen dritten Spender eingeleitet. Die Haupt HLA Loci sind auf dem Chromosom 6 lokalisiert und eng miteinander verbunden. Da jeder Mensch ein Chromosom von seiner Mutter und eines von seinem Vater erhält, hat jedes Geschwister eine Chance von  $\frac{1}{4}$ , ein passender Spender zu sein. Bei einer ‚vollständigen‘ Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger stimmen die Loci der Allele für HLA-A, -B und -DR überein. Andere größere Loci, wie HLA-C oder -DQ können das Ergebnis der Behandlung beeinflussen und müssen daher im Rahmen der Suche nach einem unverwandten Spender ebenfalls geprüft werden. Dem HLA-C wird inzwischen eine ebenso große Bedeutung wie den HLA-A und -B zugesprochen. Eine sorgfältige HLA Bestimmung ist lebenswichtig, aktuell werden dazu molekulare Sequenzmethoden angewandt. Die deutsche Knochenmarkspenderdatei (DKMS) hat 2,5 Mio. potentielle Spender registriert; im amerikanischen National Marrow Donor Programme (NMDP) sind es 4 Mio. Spender. Die Wahrscheinlichkeit, aus diesen Datenbanken einen HLA-A, -B und -DR kompatiblen Spender zu finden, liegt daher im Durchschnitt bei 65% bis 70% (Soiffer 2008). In Abhängigkeit vom HLA Typ können sich jedoch erhebliche Unterschiede in der Spenderverfügbarkeit ergeben. Somit kann es viele Monate in Anspruch nehmen, bis ein Spender gefunden, zur Spende freigegeben wird und schließlich sein Knochenmark spenden kann.

Auch mit einem vorhandenen ‚komplett‘ gematchten Spender sind Komplikationen, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird, keineswegs

ausgeschlossen. Der Grund dafür sind die minor HLA Antigene, welche die Abstoßungsreaktion hervorrufen und schwer zu bestimmen sind. Das liegt zum einen daran, dass sie nicht auf dem Chromosom 6 liegen und eine ‚komplette‘ Übereinstimmung auf diesem Chromosom damit nicht ausreicht. Je größer die HLA Abweichung ist, desto höher ist das Risiko, eine Komplikation zu erleiden. Eine ABO Kompatibilität ist zwar wünschenswert aber nicht notwendig.

### **1.1.2 Transplantations-assoziierte Komplikationen**

Zu den Komplikationen der Stammzelltransplantation zählen neben der bereits erwähnten GvHD, infektiöse Komplikationen und behandlungsassoziierte Organschäden. Zu den Letzteren zählen schwere Krankheitszustände wie das Idiopathische Pneumonie Syndrom (IPS), die Interstitielle Pneumonitis (IP), die hepatische Veno-occlusive Erkrankung (VOD), das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), eine Kardiomyopathie, neurologische Störungen, eine Katarakt und sekundäre Malignome.

Die infektiösen Komplikationen einer Stammzelltransplantation hängen von mehreren Faktoren ab, zu denen vor allem die verlängerte Granulozytopenie und die Beschädigung der Barrierefunktion der Mukosa zählen. Aber auch iatrogene Faktoren wie die Verabreichung von Antibiotika, Immunsuppressiva, ein zentralvenöser Zugang und Störungen der Immunität im Rahmen der Immunrekonstitution oder GvHD erhöhen das Risiko fataler Infektionen. Die Bandbreite der möglichen Infektionen umfasst typischerweise opportunistische Erreger wie den *Pneumocystis carinii* (PCP), die bei immunsupprimierten Patienten vermehrt vorzufinden sind, kann aber auch alle anderen Formen annehmen. Dabei sind besonders hervorzuheben: Bakterielle Infektionen, die in der Phase der Neutropenie eine akute Notfallsituation darstellen, Pilzpneumonien, denen durch eine kontinuierliche Prophylaxe vorgebeugt werden soll und virale Infektionen aus der Familie der Herpesviridae (HSV, CMV, VZV, EBV). Wichtig ist festzuhalten, dass das Infektionsrisiko die Mortalität entscheidend beeinflusst.



Die GvHD ist die Ursache vieler Komplikationen bei der Stammzelltransplantation, entweder durch einen direkten Organschaden oder durch infektiöse Komplikationen im Rahmen der Behandlung der GvHD. Sie wird in zwei Formen unterteilt, die historisch aus den Daten zum Langzeitüberleben aus den 1980er Jahren gewachsen sind: die akute aGvHD und die chronische cGvHD. Die aGvHD entwickelt sich typischerweise in den ersten drei Monaten (vor Tag 100) nach der Transplantation und befällt typische Organsysteme im Rahmen einer massiven Entzündungsreaktion. Diese sind vor allem die Haut, der Magendarmtrakt und die Leber. Dementsprechend ist auch die klinische Klassifizierung geordnet, die sowohl den Schweregrad als auch die typischen Organsysteme umfasst. Es gibt allerdings auch Beschreibungen einer GvHD an anderen Organsystemen, wie z.B. der Lunge. Bei einer allogenen Transplantation mit unverwandten Spendern liegt die Inzidenz einer mittelgradig- bis schweren GvHD (Stadium II-IV) bei ca. 45% bis 70% (Soiffer 2008). Diese Patienten haben eine deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität.

Die cGvHD tritt später als die aGvHD auf (nach Tag 100 nach allogener Transplantation) und unterscheidet sich klinisch, da sie eher an eine autoimmune Kollagenose erinnert. Die Patienten werden in den Folgemonaten und -Jahren nach der Transplantation mit sklerodermatösen Hautveränderungen, einer Keratokonjunktivitis, Sicca Syndrom, lichenoider Läsionen und pulmonalen Veränderungen vorstellig. Die Einteilung der cGvHD reicht von subklinischen- zu klinischen-, von begrenzten- bis zu extensiven Formen.

### **1.1.3 Die nachhaltige Eliminierung der vorliegenden malignen Krankheit**

Für viele hämatologische Erkrankungen ist die Knochenmarktransplantation (KMT) die einzige wirkliche Heilungsmöglichkeit, daher ist die nachhaltige Eliminierung der Krankheit ein entscheidendes Kriterium in der Begründung der invasiven Therapiemaßnahme. Die Heilungsraten nach einer allogenen Stammzelltransplantation unterscheiden sich je nach Krankheit und Alter des

Patienten. Zudem spielen die behandlungsassoziierten Komplikationen eine entscheidende Rolle für das Gesamtüberleben.

Der entscheidende Vorteil im Vergleich zur Hochdosistherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation liegt in einem immunologischen allogenen Effekt, der auch graft-versus-tumor (GVT) Effekt genannt wird. Die Existenz dieses Effekts wird durch Hinweise aus verschiedenen Quellen belegt: Zuerst einmal findet man eine höhere Rückfallrate der malignen Krankheit bei Patienten, die eine syngenetische Transplantation erhalten haben im Vergleich zu den Patienten, die allogene behandelt wurden (Zittoun et al. 1995). Ein Einflussfaktor ist dabei die Möglichkeit einer Transplantatverunreinigung mit residualen Tumorzellen, die zu einem Rezidiv führen kann. Weiterhin wurde bei den Patienten mit einer GvHD nach allogener Transplantation eine geringere Rückfallrate beobachtet, was die immunologische Komponente im Heilungsprozess verdeutlicht (Sarantopoulos et al. 2009). Zudem sind die Rückfallraten auch bei den Patienten erhöht, bei welchen zur GvHD Prophylaxe die alloreaktiven T Zellen aus dem Spenderprodukt eliminiert wurden (Goldman et al. 1988). In Patienten mit Anzeichen eines Rückfalls kann durch Weglassen der Immunsuppression eine Remission erzielt werden. Ein weiterer direkter Beweis liegt in der Möglichkeit einer donor lymphocyte infusion (DLI), die zuerst bei CML Patienten im Rückfall nach allogener Transplantation angewandt wurden. Dabei werden bei einem Rückfall dem Patienten in mehreren Sitzungen Spenderlymphozyten infundiert, um den GVL Effekt zu stimulieren (Orsini et al. 2000). Bei der CML kann durch eine DLI in >70% der Fälle eine komplette zytogenetische Remission erzielt werden. Es ist wichtig zu bemerken, dass die DLI mit einer erhöhten GvHD Inzidenz assoziiert ist, diese muss aber nicht zwangsläufig induziert werden. Der Erfolg der DLI Therapie hat auch zur schnellen Verbreitung von Induktionstherapien mit reduzierter Intensität geführt, welche vor allem bei älteren Patienten eingesetzt werden.

## **1.2 Die Nabelschnurbluttransplantation (UCBT) bei Kindern und Erwachsenen**

Beginnend mit Stammzellen aus Knochenmark werden regelmäßig neue Stammzellquellen erprobt, da verwandte Spender nicht für alle Patienten verfügbar sind und die behandlungsassoziierte Morbidität und Mortalität weiterhin hoch sind (Soiffer 2008). GCSF-mobilisierte periphere Stammzellen stellen bei unverwandten Spendern heute die größte Stammzellfraktion dar. Dabei werden die Spender über wenige Tage mit GCSF stimuliert und ihre Stammzellen aus peripherem Blut aphasisiert. Stammzellen aus Nabelschnurblut (umbilical cord blood = UCB) werden bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien eingesetzt, wenn diese keinen passenden HLA-gematchten Spender finden.

Aufgrund seiner begrenzten Stammzellquantität wurden Stammzellen aus Nabelschnurblut zunächst nur bei Kindern eingesetzt (Laughlin et al. 2001b), aber seit ca. 10 Jahren auch regelmäßig bei erwachsenen Patienten. Sie bietet für Patienten, die keinen geeigneten Spender finden können, vielfältige Vorteile (Gluckman 2001). Besonders ethnische Minderheiten, Patienten mit Migrationshintergrund und gemischter Ethnie können von dieser Möglichkeit profitieren, da sie in den klassischen Spenderdatenbanken seltener ein passendes Match finden. Dennoch bleibt dieses Behandlungsverfahren mit einer erhöhten behandlungsassoziierten Morbidität und Mortalität im Vergleich zu den etablierten traditionellen Methoden behaftet (Barker et al. 2005). Es hat sich herausgestellt, dass die geringe Zellzahl und das verlängerte Engraftment die Haupthürde für eine standardisierte Nutzung der Nabelschnurbluttransplantation darstellen (Wagner et al. 2002).

Der erste Einsatz von Stammzellen aus Nabelschnurblut im Rahmen einer allogenen Transplantation (umbilical cord blood transplantation, UCBT) fand 1988 in Paris durch Eliane Gluckman bei einem pädiatrischen Patienten mit Fanconi Anämie statt (Gluckman et al. 1989). In der Folge wurde diese Methode auch in erster Linie bei Kindern angewandt. Alle Studien in den 1990er Jahren konzentrierten sich auf diese Zielgruppe. Über lange Zeit wurde

die limitierte Stammzellmenge im Nabelschnurblut als Begründung der Unmöglichkeit seiner Verwendung bei erwachsenen Patienten angesehen. Aber die Verwendung neuer Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität und die Einführung von doppelt-gemismatchten Blutprodukten unter der Verwendung von zwei verschiedenen Nabelschnurblut-Spendern eröffnete zum Ende der 1990er Jahre neue Perspektiven für adulte Patienten und selbst Senioren.

2001 veröffentlichten Laughlin und Kollegen (Laughlin et al. 2001a) die erste Studie zu adulten Patienten inklusive klinischer Daten zum Engraftment und zum Überleben. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie wurden in größeren Untersuchungen von der Studiengruppe um Laughlin (Laughlin et al. 2004) und von der EUROCORD Gruppe unter der Leitung von Rocha und Gluckman (Rocha et al. 2004) publiziert. Beide Studien wurden in derselben 2004er Ausgabe des New England Journals of Medicine (NEJM) veröffentlicht und berichteten von zwei Patientenkohorten, die jeweils Nabelschnurblutstammzellen oder Knochenmarkstammzellen erhielten. Die oben genannten Studien zeigten, dass das Leukozyten Engraftment bei den Patienten mit Knochenmarkstammzellen von unverwandten Spendern schneller verlief und die Nabelschnurblutkohorte eine höhere Inzidenz und Mortalität bei Infektionskrankheiten aufwies. Die Patienten der Nabelschnurblutkohorte entwickelten hingegen geringere Raten von sowohl akuter- als auch chronischer graft-versus-host-disease (GvHD). Obwohl UCB Transplantate immer HLA-teilmismatched sind, wurde in einigen Studien gezeigt, dass die Inzidenz von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen (graft-versus-host-disease GvHD) im Vergleich zur konventionellen Transplantation mit gematchten Stammzellen nicht erhöht ist. Dies gilt sowohl im Vergleich zu GCSF-mobilisierten Stammzellen aus peripherem Blut als auch im Vergleich zu klassischem Knochenmark (Rocha et al. 2000, Madrigal et al. 1997). Dennoch gab es einige unstimmige Ergebnisse zwischen den beiden Studien, die weitere Fragen offen ließen.

Dem Problem der verzögerten Erholung der Neutrophilen Granulozyten wurde mit Konditionierungsregimes von reduzierter Intensität (Mini-allo TX) begegnet, die in einer verbesserten Neutrophilen Erholung resultierten (Barker et al.

2003b). Dennoch stellt die vergleichbar geringe Zahl an Stammzellen in den UCB Blutprodukten eine Begrenzung für die Verwendung bei erwachsenen Patienten dar. Dies führte in der Vergangenheit regelmäßig zu einer verzögerten und häufig zu insuffizienter Rekonstitution der lymphoiden und myeloiden Zellreihen (Barker 2003a, Rocha et al. 2000, Gluckman et al. 1997). Die verzögerte Immunrekonstitution führt bei adulten Patienten zu einem erhöhten Infektionsrisiko in der verlängerten Neutropeniezeit. Bei Kindern hingegen lassen sich regelmäßig suffiziente Stammzellzahlen erreichen, die Behandlungsmethode gilt bei dieser Patientengruppe bereits als etabliert.

Da die absolute Zahl an Leukozyten und besonders an CD34+ positiven Zellen ein prädiktiver Faktor für das Engraftment der neutrophilen Granulocyten und Thrombozyten darstellt, sind viele UCB Blutkonserven aufgrund ihrer Zellzahl nicht für Erwachsene geeignet. Einzelne Zentren öffnen die Möglichkeit der UCB Transplantation ausschließlich für Kinder (Barker et al. 2005).

Eine Option, suffiziente CD34+ Mindestzellzahlen für erwachsene Patienten zu erreichen, erschließt sich daher aus der Transplantation mehrerer UCB Produkte von mehreren Spendern, die jeweils HLA gemismatched sind (Ballen et al. 2007, Thomson et al. 2000). Diese doppelte Nabelschnurbluttransplantation (DUCBT= double umbilical cord blood transplantation) hat im Vergleich zu historischen Kontrollen aus bereits publizierten Studien eine Verringerung der Zeitspanne zum Engraftment der Neutrophilen Granulocyten und Thrombozyten gezeigt (Ballen et al. 2007, Thomson et al. 2000). Eine doppelte Nabelschnurbluttransplantation bei einer Konditionierung mit reduzierter Intensität korreliert mit einer höheren Überlebensrate als eine Transplantation mit Stammzellen aus der Nabelschnur eines einzelnen Spenders (Barker et al. 2003b). In der Tat sank dabei die behandlungsassoziierte Mortalität (treatment-related mortality). Hingegen erhöhte sich die Rate der aGvHD im Vergleich zu Nabelschnurbluttransplantationen mit einem einzelnen Spender.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Transplantation mit 2 jeweils partiell gemismatchten DUCB Produkten nicht zu einem erhöhten Risiko einer akuten oder chronischen GvHD führte (Ballen et al. 2007, Brunstein et al. 2011). Es

gibt allerdings bis zum heutigen Tag noch keine prospektive Untersuchung, welche den Vorteil der verkürzten Zeitspanne beim Engraftment belegt. Die Datenlage bleibt weiterhin verbesserungswürdig.

### **1.2.1 Die Evidenzproblematik der allogenen Stammzelltransplantation**

Die allogene Stammzelltransplantation ist ein intensiver, kurativer Therapieansatz, welcher aufgrund der starken behandlungsassoziierten Morbidität und Mortalität nur für bestimmte Patientengruppen sinnvoll ist. Die Beurteilung, ob eine Transplantation für einen Patienten eine geeignete Therapie darstellt, ist schwierig zu beantworten, da die Antwort auf der Einschätzung beruht, ob der Patient aus der intensiveren Therapie einen Überlebensvorteil erzielt, der den potentiellen Risiken der Behandlung statistisch überlegen ist.

Für die Krankheiten, wie der rezidierten akuten Leukämie, wiederkehrendem Hodgkin Lymphom oder niedriggradigen Lymphomen stellt diese Behandlung oftmals die einzige Heilungsmöglichkeit dar. Da es in der Vergangenheit nur eine überschaubare Anzahl randomisierter klinischer Studien gab, welche die Stammzelltransplantation mit der konventionellen Therapie verglichen, obliegt die Einschätzung bei häufig auftretenden Grenzfällen der Erfahrung des Transplantateurs. Man geht heute davon aus, dass z.B. Patienten mit komplexen Chromosomenaberrationen (z.B. hoch aberranter Karyotyp) bei einer AML und einem Philadelphia Chromosom (bcr-abl Translokation, t9;22) bei einer ALL eine allogene Transplantation in der ersten kompletten Remission (CR1) empfohlen werden kann. Bei anderen Patienten mit derselben Grunderkrankung ist die Datenlage weniger deutlich und es gibt sogar gegensätzliche Ergebnisse aus verschiedenen nicht-randomisierten Studien, dies betrifft vor allem Patienten mit intermediärem Risiko. Es gibt aber aktuell Bestrebungen, die Evidenz in dieser Frage über die Diskussion im Rahmen von Metaanalysen zu erhöhen (Pidala et al. 2011).

Zurzeit gibt es zusätzlich neue Ansätze in der Frage der Randomisierung, in diesem Zusammenhang soll besonders die *Mendelian Randomization* erwähnt

werden (Wheatley und Gray 2004). Bei dieser „mendelischen“ Art der Randomisierung erfolgt die Kohorteneinteilung ausschließlich nach der Spenderverfügbarkeit innerhalb der Siblings. Das Vorhandensein eines passenden Spenders wird dabei als Surrogatmarker der Randomisierung angesehen. Wenn eine Fremdspendersuche eingeleitet werden muss, wird dieser Patient in die zweite Kohorte randomisiert. Da das Vorhandensein eines Familienspenders als aleatorisch angenommen wird, erfolgt somit eine Randomisierung, die nicht mit der Transplantationsentscheidung interferiert und auch unabhängig von dieser Entscheidung erhalten bleiben muss. Der Zweck dieser Bemühungen ist es, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse im Sinne der evidence based medicine (EBM) zu erhöhen.

Obwohl es zum heutigen Zeitpunkt einzelne Übersichtsarbeiten zur Verwendung von Nabelschnurblutprodukten in der allogenen Transplantation gibt (Brunstein und Weisdorf 2009), existiert keine systematische Übersichtsarbeit zu randomisierten klinischen Studien (RCTs). Ein Cochrane Review Projekt zu dieser Frage befindet sich derzeit in der Vorbereitung. Die Entscheidung zwischen einer klassischen und einer auf Nabelschnurblut basierenden Transplantation wird weiterhin unter dem Gesichtspunkt der Spenderverfügbarkeit getroffen. Eine Beurteilung der Überlebens- und Rückfallraten aus einer randomisierten Studie wäre wünschenswert, um den Stellenwert der Nabelschnurbluttransplantation zu klären. Aktuell gibt es zwei offene randomisierte Studien, die den Effekt der UCBT bei einer adulten Patientenpopulation untersuchen (NIH, Clinical Trial Database, 2012).

### **1.2.2 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation**

Obwohl der Prozess des Engraftment über die letzten Jahre signifikant verbessert wurde, ist der Prozess der Immunrekonstitution nach der Stammzelltransplantation bisher unzureichend geklärt. Im Vergleich zur klassischen Stammzelltransplantation bleiben die Morbidität und Mortalität bei diesem Verfahren hoch (Rocha et al. 2001). Diese Tatsache illustriert am deutlichsten die funktionellen Unterschiede in der Immunrekonstitution zwischen den beiden Patientengruppen, die auf zellulärer und molekularer

Ebene liegen (Godfrey et al. 2005). Bei pädiatrischen Patienten wurden in der Vergangenheit signifikante Unterschiede in der Immunrekonstitution zwischen Patienten mit Stammzellen aus Nabelschnurblut und solchen mit Stammzellen aus dem Knochenmark beschrieben (Inoue et al. 2003, Thomson et al. 2000). Bei erwachsenen Patienten ist jedoch erst in letzter Zeit eine entsprechende Studie veröffentlicht worden (Jacobson, Turki et al. 2011).

Trotz dieser Fortschritte bleibt die UCB Transplantation mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität assoziiert, die in erster Linie dem Immundefizit geschuldet ist, welches verstärkte Infektionen mit sich zieht. In früheren Studien mit einfacher UCB Transplantation bei erwachsenen Patienten wurde ein schlechtes Anwachsen der T Zellen und in der Folge eine eingeschränkte Immunität beschrieben (Thomson et al. 2000, Klein et al. 2001, Pavletic et al. 1998). Daneben liegen Daten vor, die adulten Patienten eine eingeschränkte Fähigkeit zur thymischen Generation naiver T Zellen zusprechen (Komanduri et al. 2007). Dies spiegelt sich auch in der Klinik wider, denn die Patienten mit einer beschleunigten funktionellen Thymusregeneration haben verbesserte Werte der naiven und reifen T Zellen und überleben diese einschneidende Behandlung deutlich besser (Komanduri et al. 2007, Brown et al. 2010). Unabhängig von der thymischen Funktion scheinen sich aber gerade B Zellen und NK Zellen bei Patienten mit UCB Transplantaten besser zu erholen (Niehues et al. 2001).

Regulatorische Mechanismen wurden bislang im Rahmen der Nabelschnurbluttransplantation unzureichend untersucht. Es konnte allerdings in der Vergangenheit gezeigt werden, dass UCB Produkte einen relativ erhöhten Anteil von CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen (Treg) enthalten, die eine Suppressoraktivität aufweisen (Godfrey et al. 2005).



### 1.3 Die Fragestellung dieser Arbeit

Um den immunologischen Effekt einer Transplantation mit zwei unverwandten HLA-teilgemismatchten UCB Produkten bei Erwachsenen zu untersuchen, wurde prospektiv eine Kohorte von 42 Patienten rekrutiert, die zwischen 2003 und 2008 am Dana-Farber/ Harvard Cancer Center transplantiert wurden. Um eine gute Vergleichbarkeit der Daten zu erreichen, wurde ebenfalls im gleichen Zeitraum eine Kohorte von 102 erwachsenen Patienten untersucht, welche GCSF mobilisierte Stammzellen von unverwandten HLA-matchten Spendern erhalten haben.

Ausgehend von der uneinheitlichen Datenlage aus bereits veröffentlichten Studien ist die Evaluation der Immunrekonstitution in dieser Patientengruppe das Ziel dieser Arbeit. Dabei sollen Interaktionsmechanismen des Immunsystems im Allgemeinen und besonders unter der Sondersituation der Transplantation beleuchtet werden. Im Rahmen der Stammzelltransplantation ist konzeptuell eine Besonderheit der experimentellen Medizin gegeben. Die Patienten werden einer Situation ausgesetzt, in welcher sich das Immunsystem komplett neu etablieren muss. Dieser Prozess wird auch als Immunrekonstitution bezeichnet. Diese Sondersituation erlaubt eine Studie von diversen Mechanismen des Systems, welches hier nicht nur in einzelnen Aspekten *in vitro* studiert werden kann, sondern eine Gesamtbetrachtung der Interaktionen der beteiligten Zellgruppen und Faktoren *in vivo* erlaubt. Trotz einer geringeren Trennschärfe in der Betrachtung der einzelnen Mechanismen ist das Ziel dieser Arbeit, generelle Tendenzen in der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation aufzuzeigen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Für diese Studie wurden zwei Kohorten Patienten mit hämatologischen Malignomen eingeschlossen, die im Dana-Farber/Harvard Cancer Center eine allogene Stammzelltransplantation erhalten haben. Die DUCB Kohorte (42 Patienten) erhielt zwei teilweise gemismatchte unverwandte Nabelschnurblutprodukte (DUCB) zwischen Dezember 2003 und Januar 2008. Die MUD Kohorte (102 Patienten) erhielt GCSF-mobilisierte periphere Stammzellen vom HLA gematchten unverwandten Spendern (matched unrelated donors) zwischen Januar 2005 und Februar 2009. Alle Patienten wurden durch eine nicht-myeloablative Konditionierung (reduced-intensity) auf die Transplantation vorbereitet. Patienten, die vor Tag +100 nach Transplantation starben oder einen Rückfall erlitten, wurden ausgeschlossen. Die klinischen Eigenschaften der beiden Gruppen sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Eine dritte Kohorte von 30 gesunden Erwachsenen, deren Proben mit denselben Methoden analysiert wurden, ist für Vergleichszwecke ebenfalls aufgeführt worden. Für die immunphänotypische Analyse wurden Patientenproben in der Regel in den Monaten 1, 3, 6, 9, 12, 18 und 24 nach Stammzelltransplantation entnommen.

Alle Proben wurden mit schriftlichem Einverständnis der Probanden, einem Votum der lokalen Ethikkommission, dem Human Subjects Protection Committee of the Dana-Farber/Harvard Cancer Center (Protokoll Nummer 05-154) und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki gewonnen.

### **2.2 Durchflusszytometrie peripherer Blutzellen**

Die Durchflusszytometrie wurde anhand von zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Bei der ersten, die für 47% der Proben repräsentativ ist, wurde frisch entnommenes EDTA Vollblut im FACS (fluorescence activated cell sorting) unter Verwendung eines 6 Farben Reagens von monoklonalen Antikörpern, spezifisch für CD3 (FITC), CD16 (PE), CD45 (Per-CP-cy5.5), CD4 (PE-Cy7), CD19 (APC) und CD8 (APC-Cy7) analysiert. Das Vollblut wurde mit

dem kommerziell verfügbaren Sample Prep Assistant II (Becton Dickinson) zur Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Erythrocyten wurden unter Verwendung einer „FACS lysis“ Lösung lysiert und Leukozyten vor der Analyse fixiert. Die Zellen wurden mit einem FACS Canto II Gerät (BD) und der zugehörigen Software analysiert. Die Messqualität wurde durch eine Mindestzellzahl von 50.000 im Lymphozytengate gesichert.

Bei der zweiten Methode, die für 53% der Proben repräsentativ ist, wurde frisch entnommenes EDTA Vollblut im FACS mit Hilfe eines 5- oder 7- Farben Antikörperpanels untersucht, die die folgenden Oberflächenantigene abdeckte: CD3, CD4, CD5, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD25, CD27, CD45, CD45RO, CD56, CD127, NKG2D (BD Biosciences, San Jose, CA); CD3, CD8, CD14, CD20, CD56 (Beckman Coulter, Fullerton, CA); und CD123 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany).

Die Reagenzien wurden auf 4-6 FACS Röhrchen verteilt und die Erythrocyten unter Verwendung einer kommerziellen FACS Lösung (BD Pharm Lyse oder TQ Prep workstation, Beckman Coulter) lysiert. Die Zellen wurden danach mit einem FACS Canto II Gerät (BD) und der zugehörigen Software analysiert.

### **2.3 Serum Immunoglobulin Level**

Die Immunglobulinlevel im Serum wurden durch standardisierte Methoden des klinischen Labors bestimmt. Die IgG, IgA und IgM Assays wurden mit einem Nephelometer durchgeführt.

### **2.4 HLA Typisierung**

Eine hochauflösende HLA-Typisierung erfolgte mittels polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (RFLP) am Brigham and Women's Hospital Tissue Typing Lab. Sequenz-spezifische Oligonukleotid Primer SSP (Invitrogen) und Sequenz-spezifische Oligonukleotid Primer SSO (Tepnel + One Lambda) Techniken wurden zur Bestimmung der HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ loci verwandt. Zur PCR wurden Thermocycler eingesetzt (ABI

2720, 9600, 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA). Das hochauflösende Typing der Nabelschnurprodukte wurde durch die jeweiligen Spenderzentren durchgeführt und wenn möglich vor Ort bestätigt. Nur die HLA-A, -B, und -DR Loci wurden für den Matchingprozess einbezogen. Eine Mindestkompatibilität von 4/6 Allelen für jeweils HLA-A, -B und -DR wurde für jeden Patienten festgelegt, jeweils im Verhältnis zueinander, die beiden Mismatches dürfen zudem nicht auf demselben Locus liegen.

## **2.5 Analysen des molekularen Chimerismus**

Zur Analyse des molekularen Chimerismus der peripheren Leukozyten, der CD3-T-Zellen und der CD15 Granulozyten wurden EDTA Blutproben der Patienten erhoben. Weitere Proben aus Knochenmarkpunktionen wurden zur Bestimmung des Knochenmarkchimerismus herangezogen. Für jeden Patienten wurden alle vier Arten des Chimerismus mindestens einmal bestimmt. Der Spenderchimerismus wurde sowohl aus peripherem Blut als auch aus Knochenmark bestimmt. Für diese Analyse wurden Daten aus den Zeitpunkten 1, 2, 3, 6, 12 und 18 Monate nach Transplantation berücksichtigt. Die Chimerismus Analysen wurden mit short tandem repeats (STR) aus einem multiplex PCR Paket mit Primern für 9 verschiedene STR Loci und einen Amelogenin Locus für X- und Y-Chromosomen durchgeführt (AmpFISTR Profiler Plus, Applied Biosystems Inc.). Die Auswertung erfolgte mittels eines 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## **2.6 Statistische Analyse**

Die Patientenstammdaten wurden numerisch gesammelt und mit Hilfe eines Fischer- oder Wilcoxin-rank-sum Tests verglichen. Die Daten zur Immunrekonstitution und zum Chimerismus wurden für jeden definierten Zeitpunkt deskriptiv analysiert und unter Verwendung eines Wilcoxin-rank-sum Tests verglichen. Alle *P*-Werte wurden beidseitig mit einem Signifikanzniveau von 0.05 angegeben, sie wurden nicht an multiple Vergleiche angepasst.

Für das Gesamtüberleben (OS) und das progressfreie Überleben (PFS) wurde für jede Patientengruppe eine Kaplan-Meier Kurve erstellt und mit dem log-rank Test verglichen. Das OS wurde vom Transplantationsdatum bis zum Sterbedatum berechnet. Das PFS wurde vom Transplantationsdatum bis zum Rückfall/Progress (relapse) oder Todestag berechnet. Patienten, bei denen keines der genannten Ereignisse (Tod/Rückfall) beobachtet wurde, sind mit den Daten ausgewertet worden, mit denen sie zuletzt (lebend und rückfallfrei; relapse-free) in der Klinik vorstellig wurden. Die Kurven zur kumulativen Inzidenz von nicht-rückfallassoziertem Tod und Progress oder Rückfall, mit oder ohne Todesfolge, wurden erstellt, um die Zeit bis zum Progress beziehungsweise bis zum nicht-rückfallassozierten Tod als gegensätzliche Risiken (competing risks) zu beschreiben. Dabei wurde die Zeit bis zum Progress und die Zeit bis zum nicht-rückfallassozierten Tod vom Tag der Stammzellgabe (Tag 0) aus berechnet. Die Differenz zwischen den Kurven zur kumulativen Inzidenz unter den gegebenen gegensätzlichen Risiken (competing risks) wurde mithilfe der Gray Methode getestet (Gray 1988). Alle Berechnungen wurden mit der SAS 9.2 (SAS Institut, Cary, NC) und R 2.10.1 Software durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Charakteristika der Patientengruppen

Eine Gesamtzahl von 144 Patienten wurde in dieser Studie eingeschlossen. 42 davon wurden unter Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurblut von zwei HLA-teilgemismatchten unverwandten Spendern (DUCB Kohorte) transplantiert, 102 Patienten erhielten periphere Stammzellen von einem HLA-gematchten unverwandten Spender (MUD Kohorte). Die klinischen Charakteristika der Patienten werden jeweils in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Die Tabelle 3 hingegen enthält die immunologischen Vergleichsdaten einer gesunden Kontrollgruppe, welche zur Normalisierung der Messergebnisse herangezogen wurde.

Tabelle 1: Klinische Eigenschaften der Patientenkohorten

	DUCB	MUD	p-Wert
N	42	102	
Medianes Alter (Alterspektrum)	49 (20, 67)	56 (20, 73)	0.005
Geschlecht (weiblich %)	20 (48)	39 (38)	0.35
Konditionierung (nicht-myeloablative)			
Bu/Flu +/- Andere (%)	0 (0)	102 (100)	---
Melphalan/Flu/ATG +/- Andere (%)	42 (100)	0 (0)	
GvHD Prophylaxe			
Siro/MTX/Tac (%)	0 (0)	84 (82)	---
Siro/Tac (%)	29 (69)	11 (11)	
MTX/Tac (%)	0 (0)	6 (6)	
Siro/MMF (%)	0 (0)	1 (<1)	
enthält Cyclosporin (%)	13 (31)	0 (0)	
Krankheiten			
AML (%)	13 (31)	19 (19)	---
ALL (%)	2 (5)	3 (3)	
CML (%)	1 (2)	3 (3)	
CLL/SLL/PLL (%)	2 (5)	13 (13)	
MDS (%)	4 (10)	20 (20)	
NHL (%)	13 (31)	16 (16)	
HL (%)	5 (12)	15 (15)	
MPD (%)	1 (2)	5 (5)	
MM (%)	0 (0)	3 (3)	
Anämie (%)	1 (2)	5 (5)	
Günstige Prognosefaktoren (%)*	14 (33)	18 (18)	0.05

\*Patienten mit einer AML oder ALL in erster Remission oder einer CML in ihrer chronischen Phase. Weiterhin Patienten mit einem MDS mit refraktärer Anämie (RA) oder refraktärer Anämie und Ring Sideroblasten (RARS)

Tabelle 2: Klinisches Outcome der Patientenkohorten

	DUCB	MUD	p-Wert
N	42	102	
Akute GvHD gr. II-IV (%)	9 (21)	12 (12)	0.19
Chronische GvHD (%)	10 (24)	55 (54)	<0.001
2-Jahres PFS (95% CI)	49% (32,64)	57% (44,68)	0.88
2-Jahres OS (95% CI)	66% (49,79)	68% (54,79)	0.93
2-Jahres NRM (95% CI)	11% (3,23)	11% (4,20)	0.63
2-Jahres Rückfallrate (95% CI)	40% (25,55)	32% (22,43)	0.87
Infektionen <100 Tage nach Transplantation			
Gesamt-	25 (59)	9 (8)	<0.001
Bakterielle-	21 (50)	8 (8)	<0.001
Virale-	12 (29)	1 (1)	<0.001
Pilz-	2 (5)	0 (0)	0.08
Gesamtinfektionsrate (%)	29(69)	34(33)	<0.001
Zeit bis zum Engraftment (Tage)			
Neutrophile Granulozyten	21.5 (13-107)	N/A	N/A
Thrombozyten	41.5 (16-162)	N/A	N/A

Tabelle 3: Immunologische Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe (in absoluten Zellen/ $\mu$ l)

	Alter*	Leukozyten	CD3	CD4	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	NKG2D+CD16 <sup>+</sup>
Min.	24	4000	572	359	19	137	70	61
Median	46	5900	1248	706	62	338	203	156
Max.	67	8900	2090	1324	118	1338	406	719

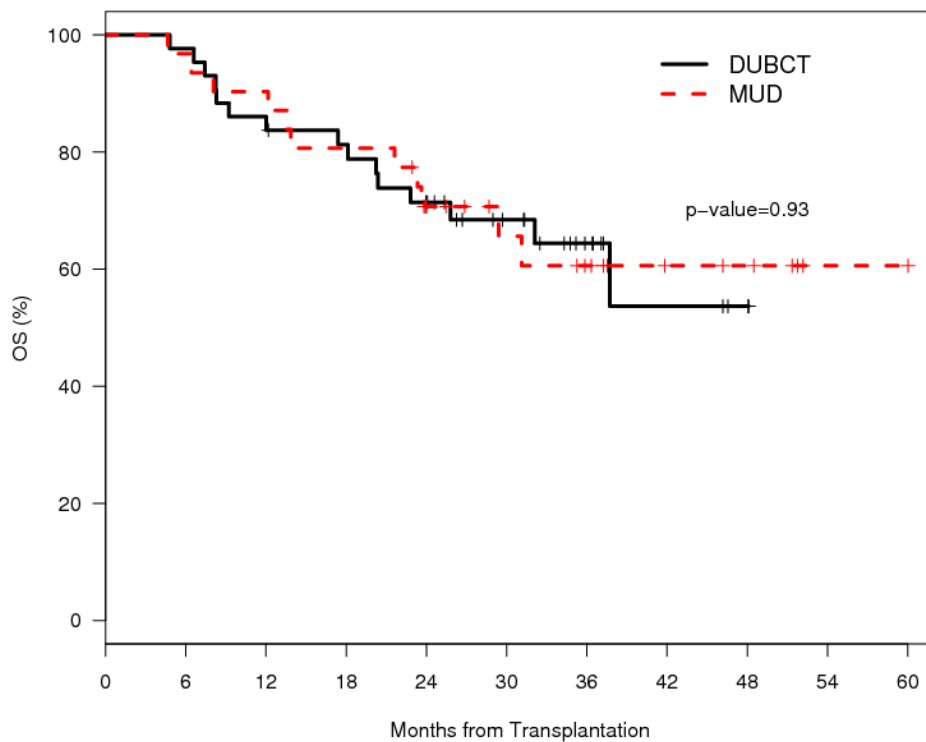
\*Geschlechterverteilung der gesunden Kontrollgruppe: weiblich 17/25

Das Konditionierungsregime für die DUCB Kohorte enthielt Melphalan, Fludarabin und ATG für alle Patienten. Der Median der totalen Zellzahl lag bei  $0.42 \times 10^8$  kernhaltigen Zellen/Kg Körpergewicht und bei  $0.28 \times 10^6$  CD34+ Zellen/Kg Körpergewicht. Die GvHD Prophylaxe bestand aus Sirolimus (Rapamycin) und Tacrolimus bei 69% der Patienten; alle anderen Patienten erhielten ein Cyclosporin-basiertes Regime zur Immunsuppression.

Die Patienten in der MUD Kohorte erhielten eine signifikant höhere Stammzelldosis, der Median der kernhaltigen Zellen lag bei  $11.47 \times 10^8$  Zellen/Kg Körpergewicht und der Median der CD34+ hämatopoetischen Stammzellen bei  $9.31 \times 10^6$  Zellen/Kg Körpergewicht. Die Differenz zwischen beiden Gruppen erklärt sich durch die begrenzte Zellzahl im limitierten Nabelschnurblutvolumen. Die Konditionierung war nicht myeloablativ und für alle Patienten basierend auf einer Kombination von Busulfan und Fludarabin (Bu/Flu). Die GvHD Prophylaxe bestand bei 93% der Patienten aus Sirolimus (Rapamycin) und Tacrolimus; 82% der Patienten erhielten ebenfalls Methotrexat (MTX).

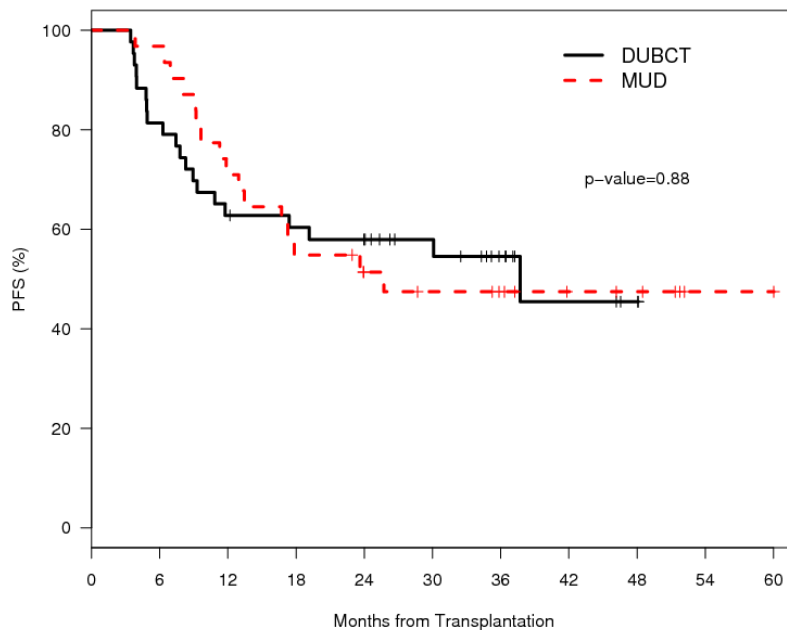
Die malignen hämatologischen Erkrankungen der beiden Patientengruppen waren generell vergleichbar. Dennoch wies die DUCB Kohorte eine größere Zahl von Patienten mit günstigen Prognosefaktoren (definiert in Tabelle 1) auf, zudem war das mediane Alter der MUD Kohorte, welches einen Risikofaktor bei der allogenen Transplantation darstellt, signifikant höher. Beide Kohorten hatten im Vergleich zu historischen Kontrollen (Soiffer 2008) eine relativ geringe Inzidenz, eine GvHD zu entwickeln (<25%), aber die Patienten der MUD Gruppe wiesen eine signifikant höhere Rate an chronischer GvHD (cGvHD) auf als die DUCB Gruppe (54% im Vergleich zu 24%,  $p < 0.001$ ). Es ergab sich keine signifikante Differenz bezüglich des 2 Jahres Gesamtüberlebens (OS) und des progressionsfreien Überlebens (PFS) zwischen beiden Gruppen (OS: 49% vs. 57%  $p = 0,88$ ; PFS: 66% vs. 68%  $p = 0,93$ ).





**Abb. 1: Kaplan Meier Kurve zum Gesamtüberleben (OS)**

Auffällig war die signifikant höhere Inzidenz von Infektionen in der DUCB Gruppe im Vergleich zu der MUD Gruppe, die in den ersten 100 Tagen nach Stammzelltransplantation besonders ausgeprägt war (69% vs. 33%,  $p < 0.001$  für die Gesamtinzidenz von Infektionen; 59% vs. 8%  $p < 0.001$  für Infektionen innerhalb der ersten 100 Tage). Insbesondere virale und bakterielle Infektionen traten vermehrt in den ersten 100 Tagen in der DUCB Gruppe auf (29% vs. 1%,  $p < 0.001$ , 50% vs. 8%  $p < 0.001$ ) während die Inzidenz von Pilzinfektionen in beiden Kohorten niedrig war.



**Abb. 2: Kaplan Meier Kurve zum Progressfreien Überleben (PFS)**

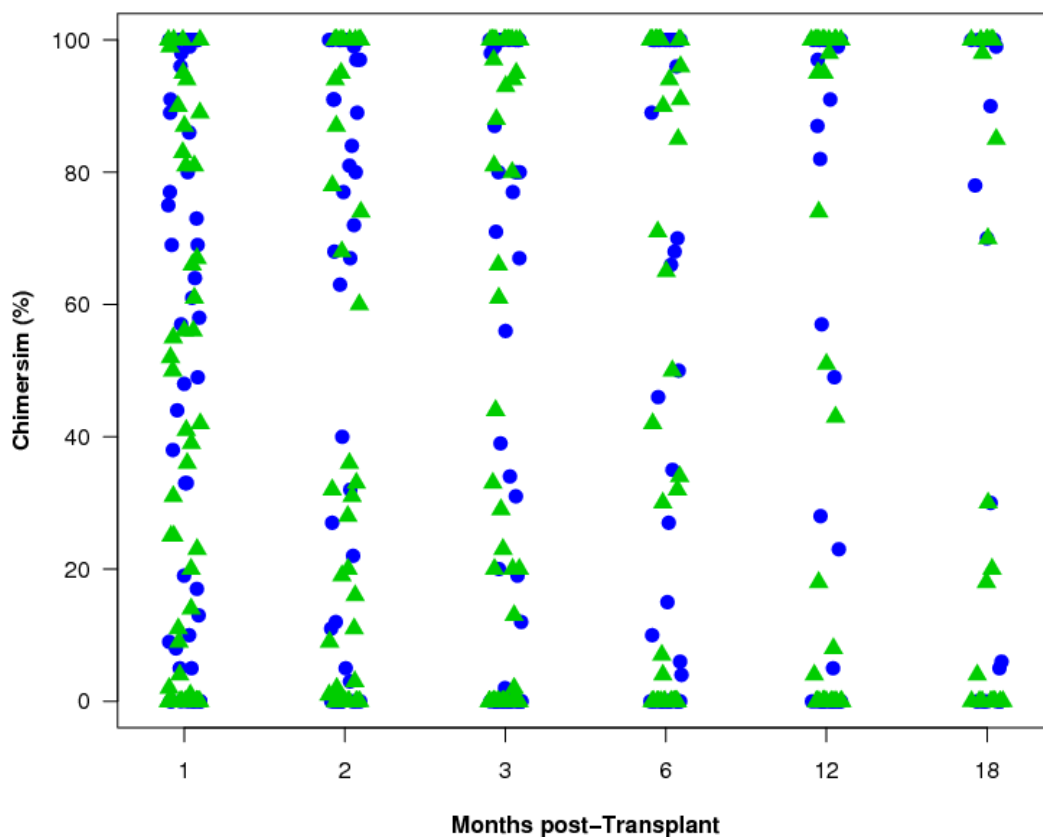
Die mediane Zeit zum Engraftment der Neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten lag bei 21 (Spektrum von 13 bis 107) und 41,5 (16-162) Tagen für die Patienten der DUCB Gruppe. Obwohl bei beiden Patientenkohorten ein nicht-myeloablatives Konditionierungsregime gewählt wurde, war die Konditionierung der MUD Kohorte weniger intensiv. Viele Patienten dieser Gruppe erreichten nicht den Nadir der Neutrophilen Granulozyten oder der Thrombozyten.

### 3.2 Chimerismusanalysen

Eine weitere Besonderheit der DUCBT liegt in dem Vorhandensein eines gemischten Chimerismus, nach erfolgter allogener Transplantation. Dieser Chimerismus erklärt sich aus dem Vorhandensein von CD34+ Stammzellen von zwei unterschiedlichen Spendern, die sich in ihren HLA Merkmalen jeweils voneinander unterscheiden. Auf die Transplantation folgt eine Phase, in welcher Immunzellen von beiden Spenderstammzellen im Knochenmark sowie

im peripheren Blut nachgewiesen werden können. Dieser sogenannte „gemischte Chimerismus“ (mixed chimerism) kann eine unterschiedliche Persistenz entwickeln. Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen der Art des Chimerismus und den klinischen Charakteristika in der DUCB Kohorte.

Dabei erreichten 67% der DUCB Patienten einen dominanten Chimerismus (>90%) eines einzelnen Nabelschnurprodukts im Monat 3 nach der Transplantation. Hingegen wiesen 33% der Patienten einen persistierenden Chimerismus mit einem Engraftment von Stammzellen aus beiden Nabelschnurprodukten auf. Bei diesen Patienten wurden die Elemente der Immunrekonstitution verglichen, ohne den Nachweis einer signifikanten Differenz zwischen dem früh dominanten Chimerismus und dem gemischt persistierenden Chimerismus zu zeigen.



**Abb. 3: DUCB Leukocyten Chimerismus (Blau = Spender 1, Grün =Spender 2)**

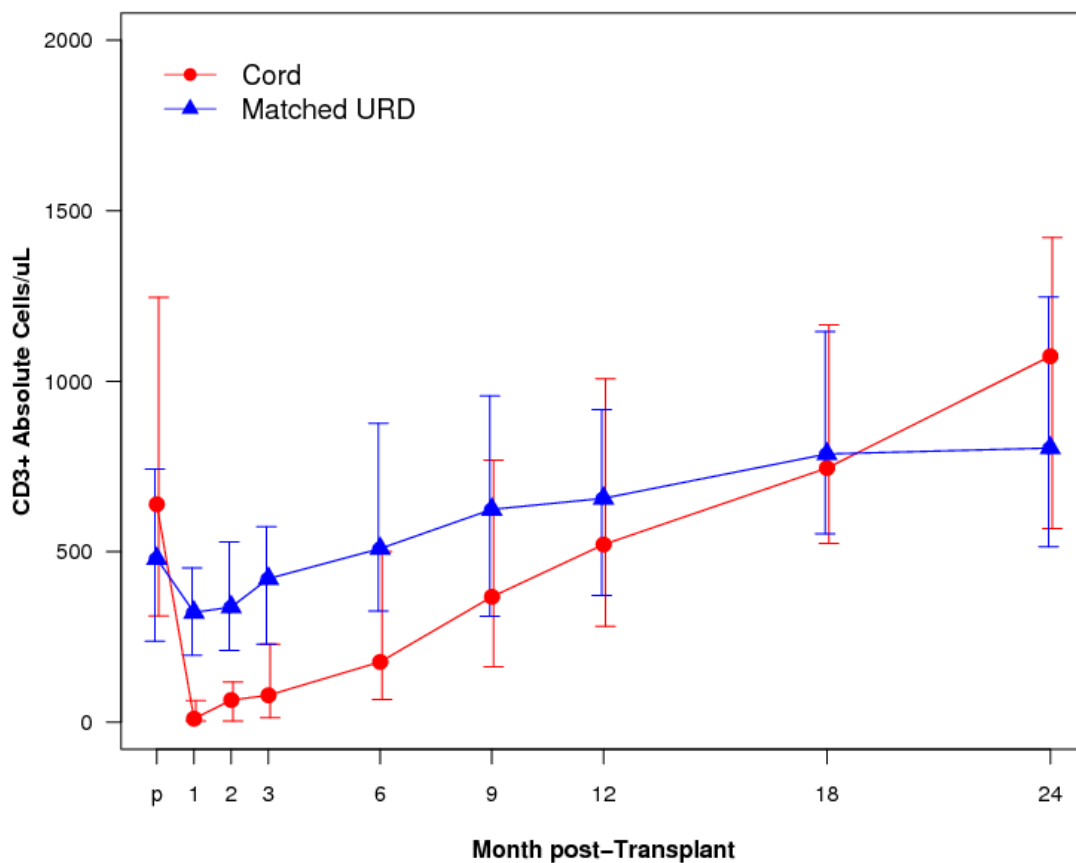
Wir beobachteten den molekularen Chimerismus der Patienten, um weitere Informationen zur Immunrekonstitution nach der allogenen Stammzelltransplantation zu erhalten. Es ließen sich dabei mehrere Chimerismus Schemata erkennen. Eine Fraktion der Patienten etablierte in den ersten drei Monaten eine Dominanz eines einzelnen Nabelschnurprodukts und eliminierte die Stammzellen des anderen Produkts völlig. Die *graft dominance* ist über eine relative Bewertung des Chimerismus von jeweils entweder 100% oder 0% Chimerismus A versus Chimerismus B dargestellt (Abb. 3). Beide Chimerismen sind komplementär und bedingen sich demnach gegenseitig. Eine weitere Patientenfraktion benötigt mehr als 3 Monate, um einen dominanten Chimerismus zu etablieren, erreicht diesen aber und stabilisiert ihn in der Folgezeit. Eine weitere Patientenfraktion konserviert einen dauerhaft gemischten Chimerismus. Bei diesen Patienten lassen sich im peripheren Blut Immunzellen beider Stammzellspender nachweisen, die sich gegenseitig tolerieren.

Wir konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Arten des Chimerismus erkennen, unabhängig davon, ob dieser auf der Basis von Leukozyten oder reinen CD3+ T Zellen gemessen wurde.

Eine kleine Gruppe von Patienten stößt beide Nabelschnurprodukte ab und erlebt eine *graft rejection*. In diesem Fall ist der Chimerismus für A und B jeweils 0%. Diese Transplantatabstoßung geht mit einer stark eingeschränkten klinischen Prognose einher. Auffällig ist allerdings die CD8 Effektor T Zellzahl bei diesen Patienten, die bei >60% der gesamten T Zellen liegt. Besonders hoch sind die CD8 Zellen bei diesen Patienten in den ersten 3 Monaten nach Transplantation, also in der Zeit, in der das Transplantat abgestoßen wurde. Die NK Zahlen unterschieden sich nicht. Die hohe Zahl der zytotoxischen T Lymphozyten (CTL) unterstützt die Hypothese einer immunologischen Transplantatabstoßung über adaptive Immunprozesse durch den Empfänger.

### 3.3 Rekonstitution der T Zellen und ihrer Untergruppen

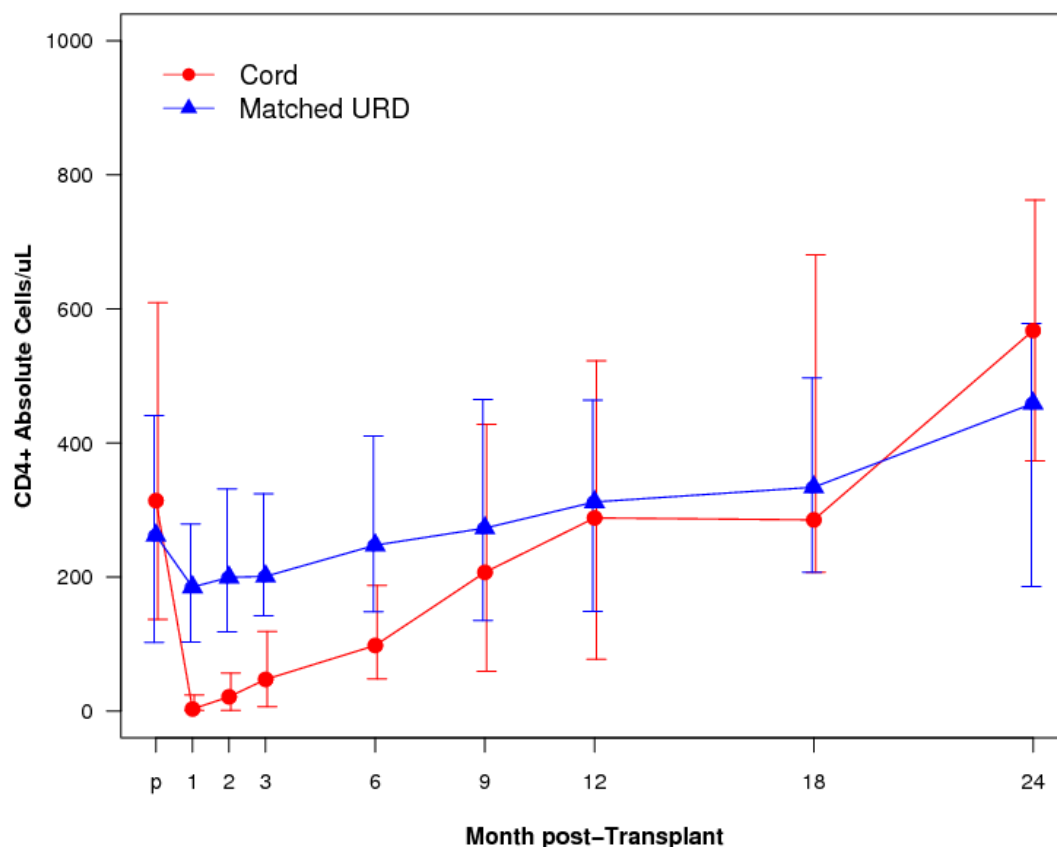
Die Rekonstitution der CD3 T Zellen war in der Gruppe der DUCB Empfänger deutlich verzögert, verglichen mit der MUD Kohorte. Diese Differenz ließ sich für mindestens 6 Monate ( $p < 0.001$ ) nach erfolgter Transplantation nachweisen. Zum Zeitpunkt von 12 Monaten nach Transplantation war die Differenz zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant ( $p = 0.41$ ) und nach 24 Monaten übertraf die mediane CD3 Zellzahl in der DUCB Gruppe sogar diejenige der MUD Gruppe (1073 Zellen/ $\mu\text{L}$  vs. 804 Zellen/ $\mu\text{L}$ ,  $p = 0.21$ ).



**Abb. 4:** Zahl der CD3<sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut der Patienten (absolute Zellen/ $\mu\text{L}$ ), Posttransplantations Follow-up über 24 Monate, p= Prä-Transplantationswert, DUCB in rot und MUD in blau.

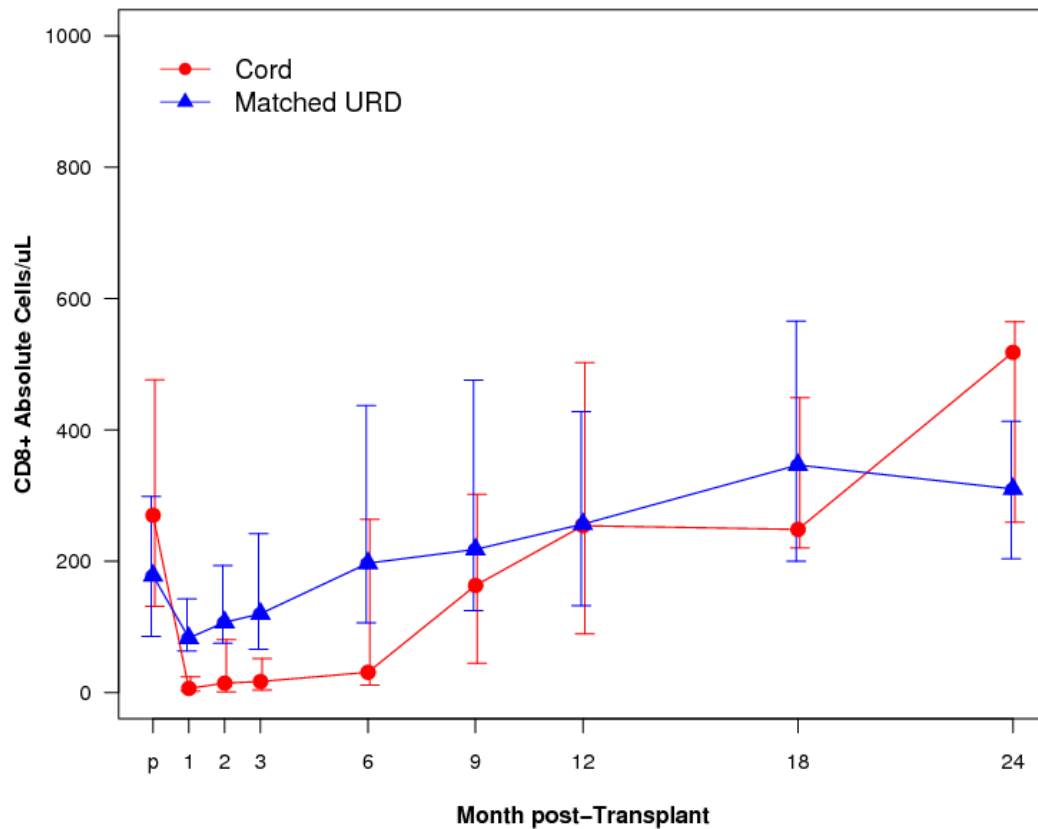
Die medianen Werte zum Zeitpunkt 24 Monate post Transplantation liegen im Spektrum der Normalverteilung für absolute CD3 T Zellen bei gesunden Erwachsenen unserer Kontrollgruppe (572-2090 Zellen/ $\mu$ L).

Die Erholung der CD4 T Zellen entwickelte sich ebenfalls verzögert in der DUCB Kohorte. Nach den ersten 6 Monaten lag die Differenz bei 98 Zellen/ $\mu$ L vs. 248 Zellen/ $\mu$ L ( $p < 0.001$ ). Die mediane Zellzahl in dieser Kohorte lag erst nach 9 Monaten über 200 Zellen/ $\mu$ L. Zum Erreichen von normalen Werten, definiert nach der gesunden Kontrollgruppe, benötigen die Patienten dieser Gruppe durchschnittlich 2 Jahre.



**Abb. 5: Zahl der CD4<sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut der Patienten (absolute Zellen/ $\mu$ L),**

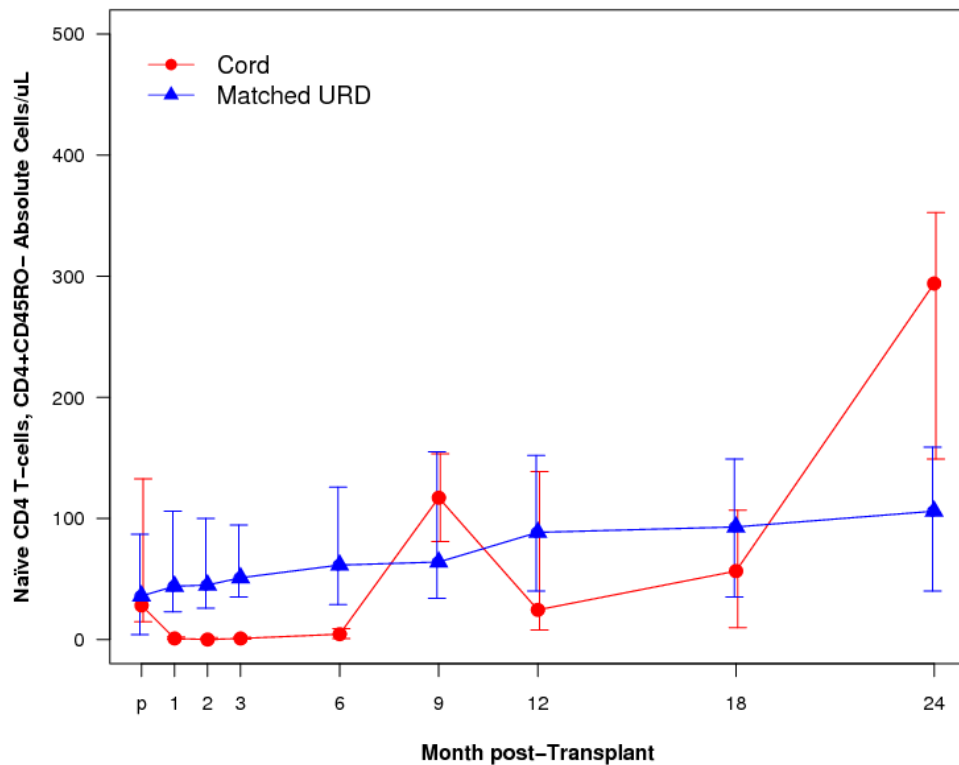
Dennoch ist die CD4 Zellzahl der DUCB und der MUD Gruppe 12 Monate nach Transplantation vergleichbar ( $p=0.44$ ).



**Abb. 6: Zahl der CD8<sup>+</sup> T Zellen (absolute Zellen/μl)**

Die Rekonstitution der CD8 T Zellen ist ebenfalls in der DUCB Gruppe verzögert (Monat 6: 31 Zellen/μL vs. 197 Zellen/μL,  $p < 0.001$ ). Auch wenn die Differenz zwischen beiden Gruppen für mindestens 6 Monate nach Transplantation signifikant ist ( $p < 0.001$ ), ist die Varianz größer als bei den CD4 T Zellen. Zudem erreichten die Patienten beider Kohorten bereits im ersten Jahr nach der Transplantation Normalwerte, definiert nach der gesunden Vergleichsgruppe. Im Monat 12 nach der Transplantation liegt die mediane CD8 Zellzahl der DUCB bei 254 Zellen/μL und der MUD bei 257 Zellen/μL ( $p = 0.65$ ).

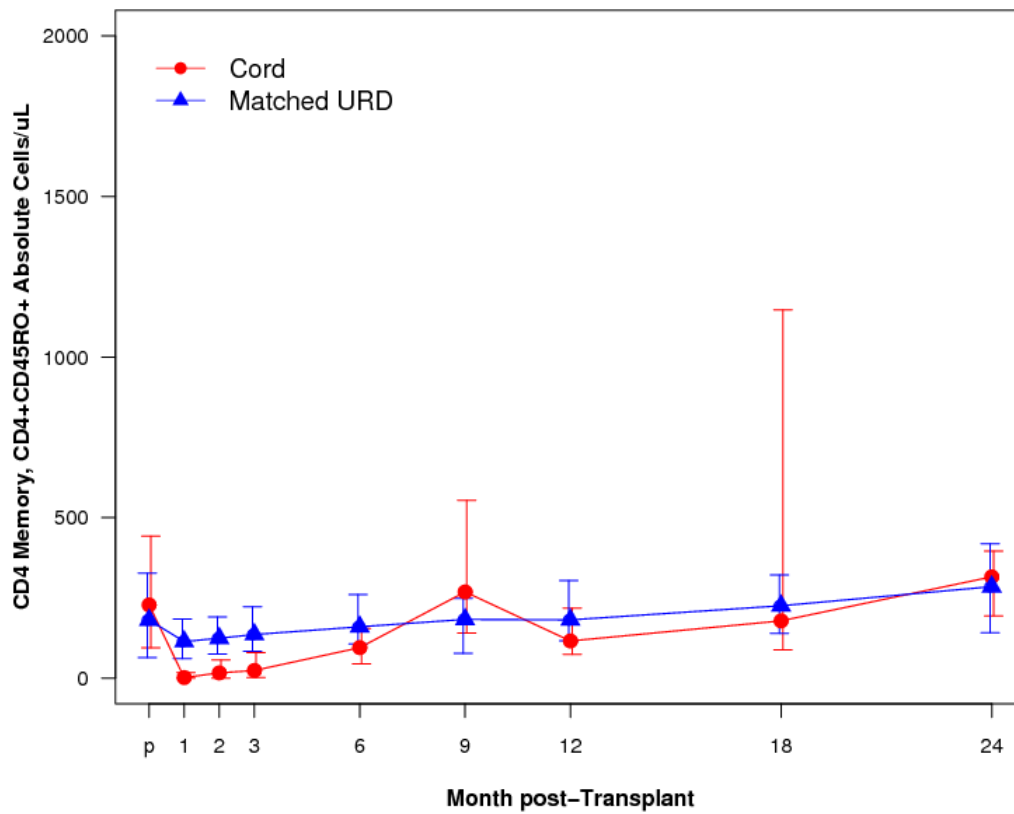
### 3.4 Rekonstitution von T Zell Subgruppen



**Abb. 7: Zahl der CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> naiven T Zellen (absolute Zellen/μl)**

In vorausgegangenen Studien wurden bereits Unterschiede in der Immunrekonstitution bei pädiatrischen Patienten gezeigt (Moretta et al. 2001). Diese Unterschiede betrafen auch die Anzahl der naiven und reifen (memory) T Zellen. In der uns vorliegenden adulten Patientenpopulation wurden naive und reife T Zellen mithilfe des Oberflächenmarkers CD45RO im Durchflusszytometer differenziert (naive T Zellen = CD4CD45RO<sup>-</sup>, reife T Zellen = CD4CD45RO<sup>+</sup>).

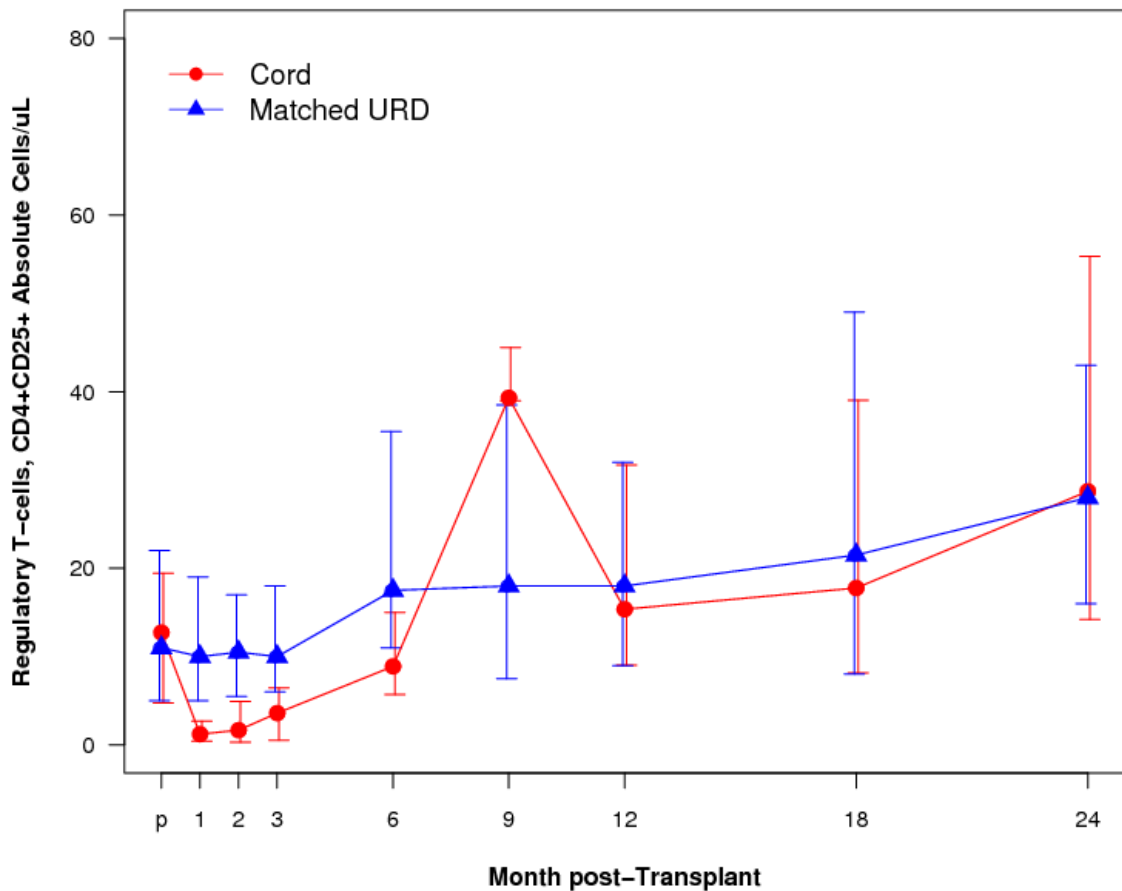




**Abb. 8: Zahl der CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> memory T Zellen (absolute Zellen/μl)**

Sowohl in absoluten Zahlen als auch in der Betrachtung relativer Werte ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit weniger CD45RO- naiven CD4 Zellen in der DUCB Kohorte, verglichen mit den MUD Gruppe (Monat 3 nach Transplantation 24 Zellen/μL vs. 136 Zellen/μL,  $p < 0.001$ ). Die reifen (memory) CD4CD45RO<sup>+</sup> T Zellen sind ebenfalls vermindert, allerdings beginnt die Erholung der reifen T Zellen in der DUCB Gruppe zwischen dem Monat 3 und dem Monat 6 nach Transplantation.

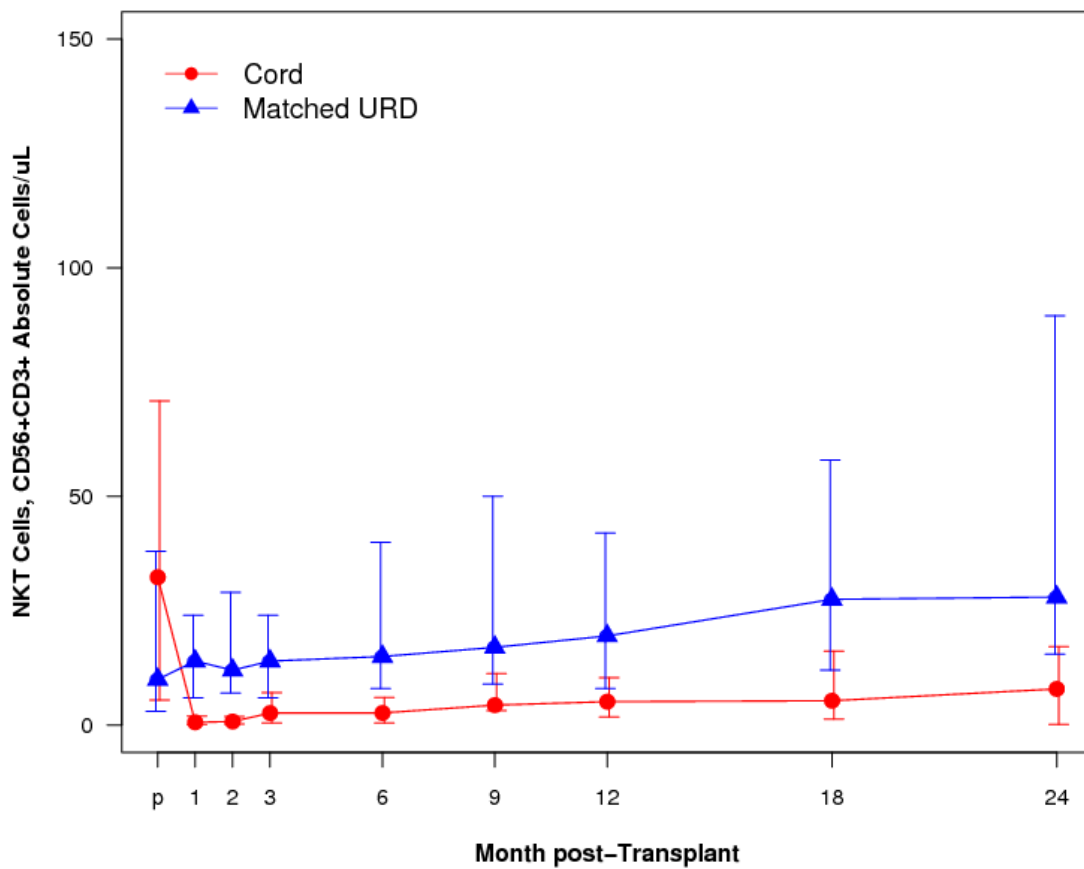
Die regulatorischen T Zellen (CD4CD25<sup>+</sup> Tregs) sind in der DUCB Kohorte in den ersten 6 Monaten nach der Transplantation signifikant niedriger ( $p < 0.004$ ) verglichen mit der MUD Gruppe.



**Abb. 9: Zahl der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen (absolute Zellen/μl)**

Nach dieser Zeit findet man keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen mehr vor. Im Vergleich mit unserer gesunden, adulten Kontrollgruppe hingegen haben sowohl die DUCB als auch die MUD Transplantatpatienten eine geringere mediane Treg Anzahl über die ersten 12 Monate post Transplantation (15 Zellen/μL vs. 18 Zellen/μL,  $p=0.85$ ). Ein normales Treg Level im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Median: 62 Treg Zellen/μL) wird hier erst nach 18 bis 24 Monaten erreicht.

Ein weiterer Unterschied lässt sich schließlich bei Zellen beobachten, welche sowohl NK als auch T Zell Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren (CD3CD56+ NKT).



**Abb. 10: Zahl der  $\text{CD56}^+ \text{CD3}^+$  NKT Zellen (absolute Zellen/ $\mu\text{L}$ )**

Diese NKT Zellen sind in der DUCB Kohorte im Vergleich zur MUD Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von Monat 1 bis Monat 24 post Transplantation reduziert (12 Monate nach der Transplantation: 5 Zellen/ $\mu\text{L}$  vs. 20 Zellen/ $\mu\text{L}$ ,  $p=0.001$ ). Die mediane Zellzahl der NKT Zellen ist ebenfalls niedriger als in der Kontrollgruppe beobachtet.

### 3.5 Rekonstitution der B Zell- und NK Zellreihen

Im Gegensatz zu der Entwicklung der T Lymphozyten erfolgt die Erholung der CD19 B Zellen in der DUCB Kohorte verglichen mit der MUD Gruppe schneller. Der CD19 B Zell Nadir wird, gemessen in absoluten Zahlen, bei beiden Gruppen einen Monat nach Transplantation erreicht. Bereits 3 Monate nach Transplantation sind die medianen B Zellzahlen in der DUCB Kohorte signifikant höher als in der MUD Kohorte (176 Zellen/ $\mu$ L vs. 21 Zellen/ $\mu$ L,  $p=0.001$ ).

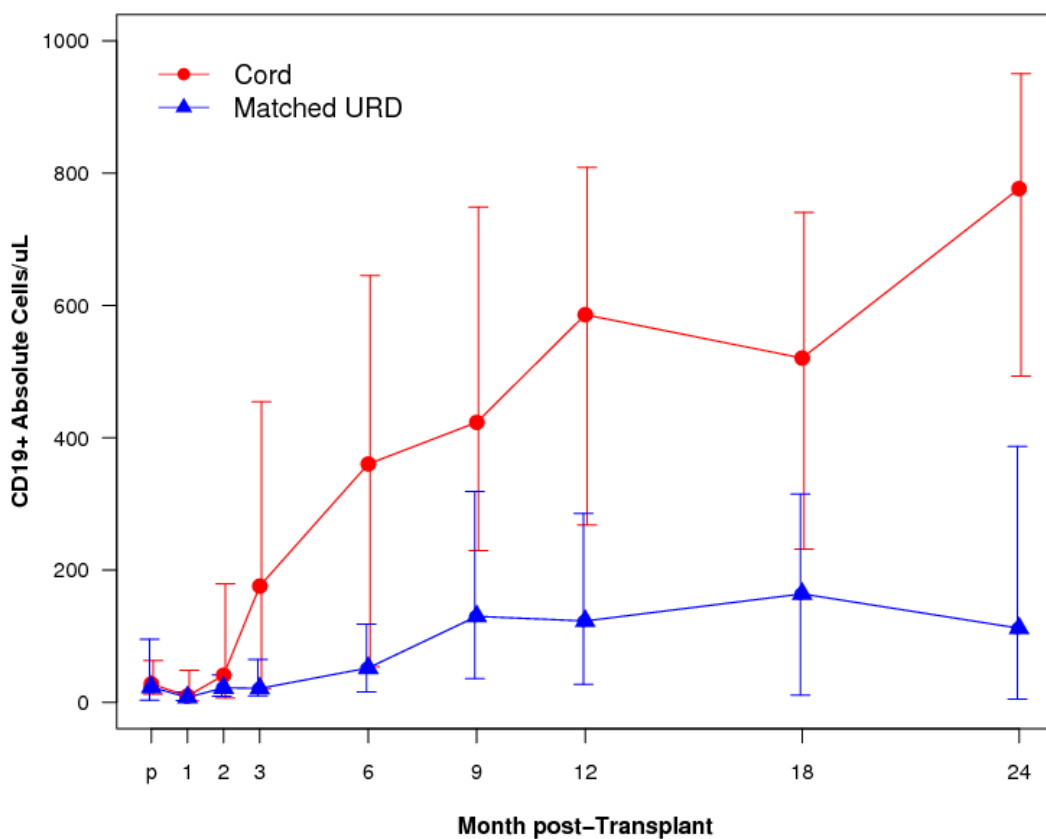


Abb. 11: Zahl der CD19<sup>+</sup> B Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)

Diese Differenz zwischen beiden Gruppen bleibt über 21 Monate erhalten und intensiviert sich im Verlauf. Wenn CD20 als B Zell Marker verwendet wird,

ergeben sich ebenfalls signifikante Unterschiede (12 Monate nach Transplantation 495 Zellen/ $\mu$ L vs. 125 Zellen/ $\mu$ L,  $p < 0.001$ ).

Es ist auffällig, dass 24 Monate nach Transplantation der Median der CD19 B Zellen in der DUCB Population höher ist als derjenige der gesunden Kontrollen. (777 Zellen/ $\mu$ L vs. 203 Zellen/ $\mu$ L).

Im Gegensatz zu den T- und B Lymphozyten fallen die CD56CD16 natürlichen Killerzellen (NK Zellen) nicht nach der Transplantation ab, sondern wachsen in beiden Patientengruppen stetig. Die Dynamik beider Kohorten unterscheidet sich allerdings beginnend mit dem ersten Monat post Transplantation (127 Zellen/ $\mu$ L vs. 68 Zellen/ $\mu$ L,  $p = 0.006$ ).

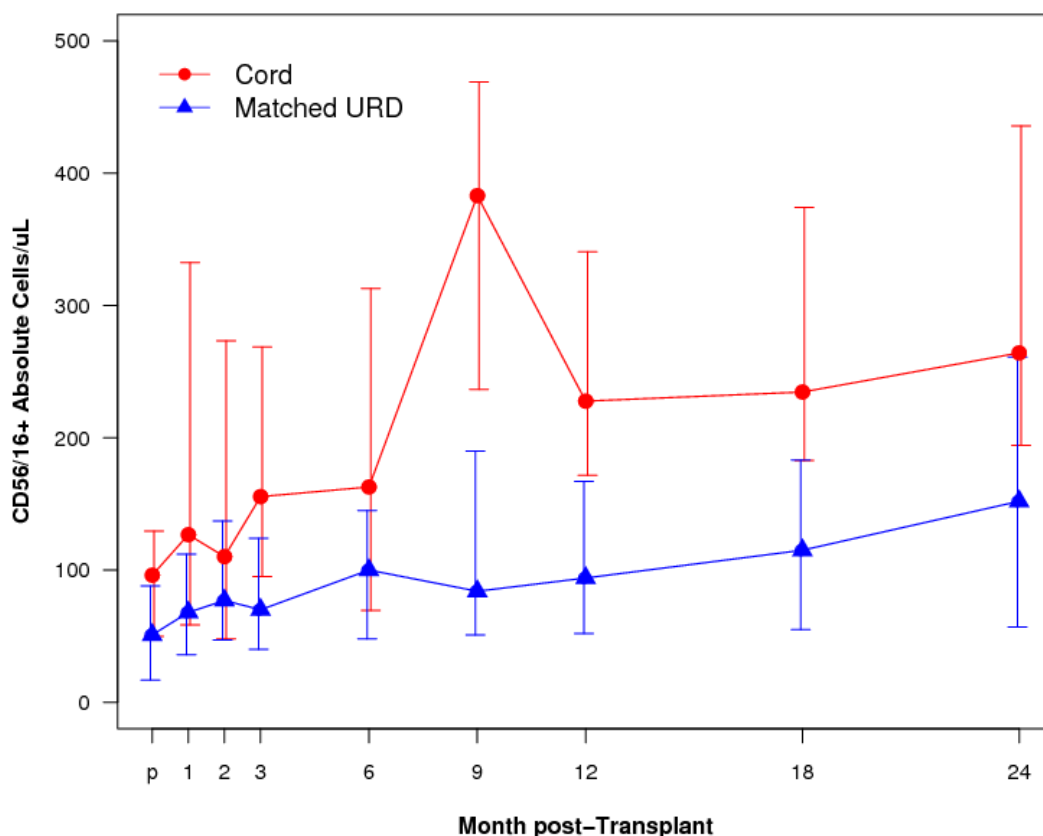
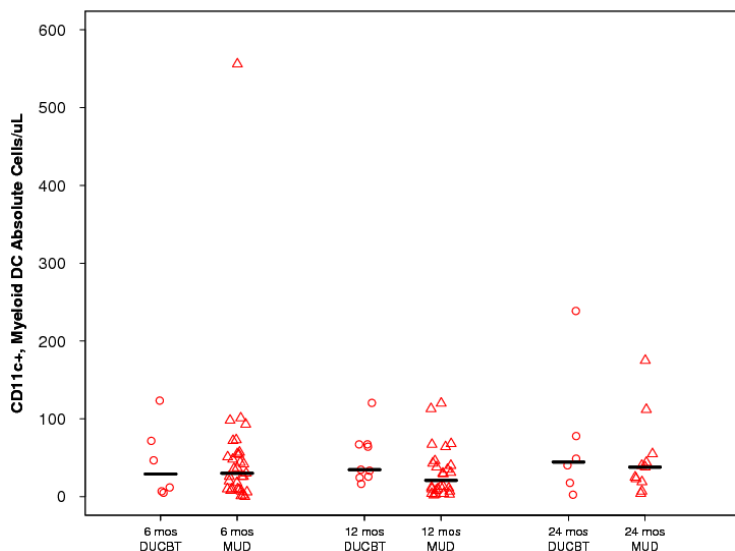


Abb. 12: Zahl der CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> NK Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)

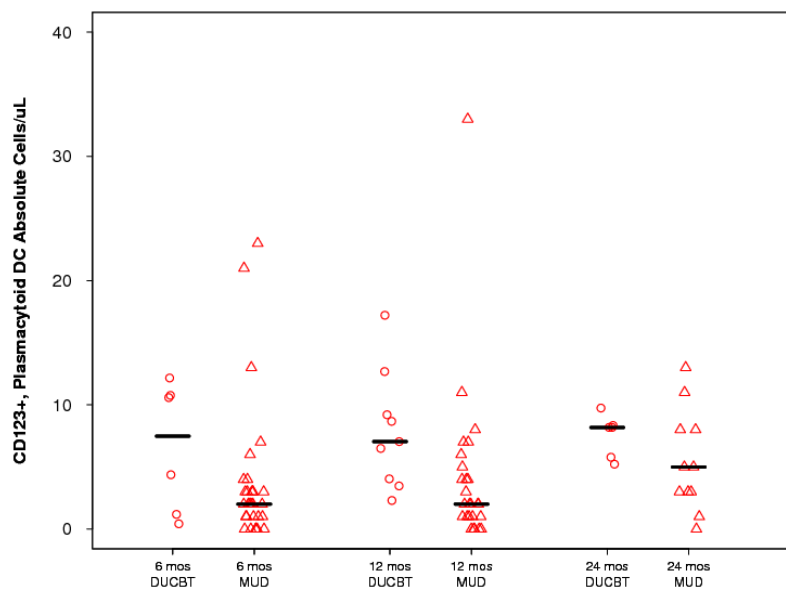
Die NK Zell Population expandiert früh und deutlich in der DUCB Kohorte, wohingegen die MUD Gruppe 18 Monate benötigt, um NK Zellzahlen im Normbereich zu erzielen. Dabei bleibt die mediane Zahl der NK Zellen in der DUCB Gruppe über die gesamten 24 Monate der Beobachtungsperiode signifikant höher als diejenige der MUD Gruppe (Monat 12: 228 Zellen/ $\mu$ L vs. 94 Zellen/ $\mu$ L,  $p < 0.001$ ; Monat 24: 264 Zellen/ $\mu$ L vs. 152 Zellen/ $\mu$ L  $p = 0.01$ ).

### 3.6 Dendritische Zellen



**Abb. 13: Zahl der CD11c<sup>+</sup> myeloiden Dendritischen Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ L) 6 Monate, 12 Monate und 24 Monate nach Transplantation, DUCB: Kreise; MUD: Dreiecke**

Myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen lassen sich über die Expression von CD11c und CD123 unterscheiden. Bei der Analyse der beiden Kohorten konnte kein signifikanter Unterschied bei den CD11c<sup>+</sup> myeloiden Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Hingegen waren die plasmazytoiden Dendritischen Zellen in der DUCB Gruppe höher als in der MUD Gruppe ( $p = 0.005$ ). Dieser Unterschied wurde im Monat 12 beobachtet und ließ sich nach 24 Monaten nicht mehr nachweisen.

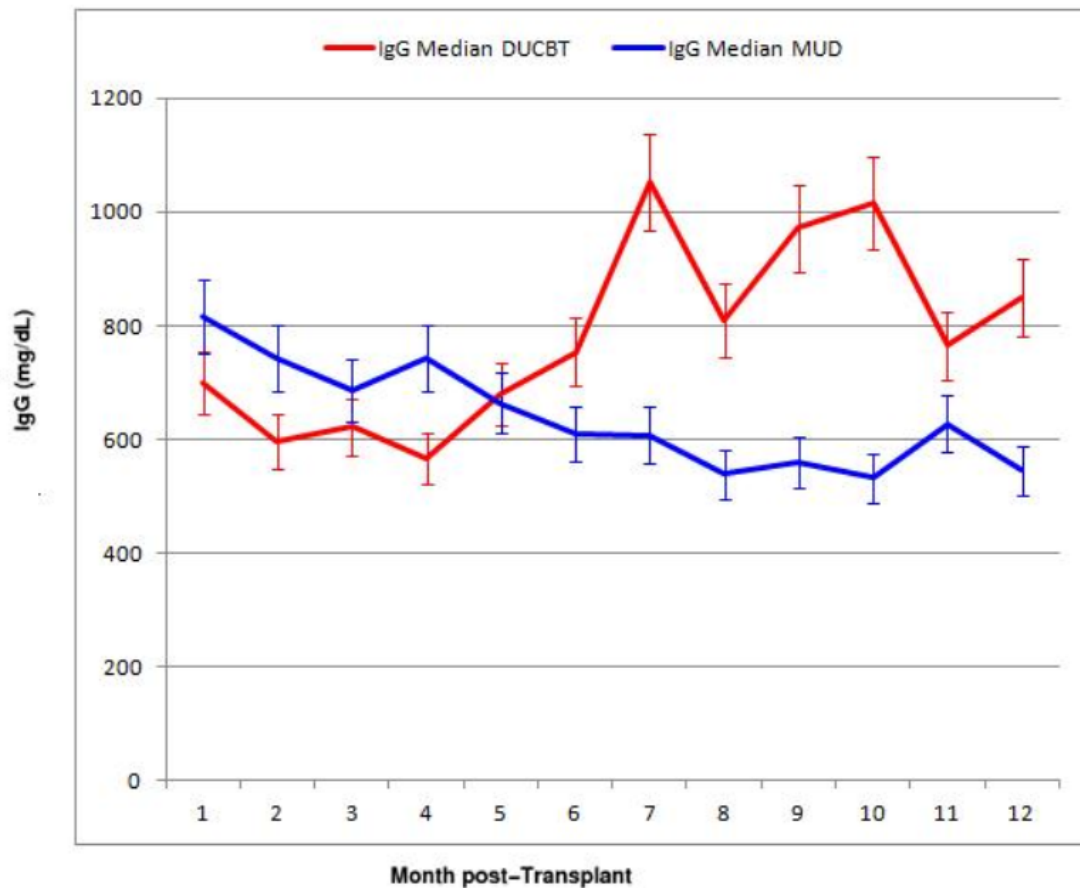


**Abb. 14: Zahl der CD123<sup>+</sup> plasmazytoiden Dendritischen Zellen (absolute Zellen/μl), 6 Monate, 12 Monate und 24 Monate nach Transplantation, DUCB: Kreise; MUD: Dreiecke**

### 3.7 Immunglobulinlevel nach Stammzelltransplantation

Um die Funktionalität der B Zell Gruppe nach DUCB Transplantation zu prüfen, wurde bei den Patienten dieser Gruppe über 12 Monate lang der Immunglobulin (Ig) Level bestimmt. Die IgG Level in beiden Patientengruppen fallen in den ersten Monaten nach der Transplantation zunächst ab. In der DUCB Gruppe erholen sich die IgG Level zwischen dem 5. und dem 6. Monat nach der Transplantation und erreichen normale Level. Hingegen fallen die IgG Level in der MUD Gruppe weiter und bleiben auch 12 Monate nach der Transplantation unter den Normalwerten für gesunde Erwachsene. Die IgG Infusionen, welche einzelne stark immunsupprimierte Patienten erhalten, konnten diese Differenz nicht erklären, da diese Patienten auch nach dem Erhalten einer Transfusion unter den Normalwerten blieben. Die IgM Level sind bei beiden Gruppen über die ersten 3 Monate niedriger als normal und erholen sich rasch zwischen dem 4. und dem 6. Monat in der DUCB und der MUD Gruppe (ohne Abbildung).

Schließlich sind die IgA Level besonders niedrig und bleiben in der DUCB Gruppe für 12 Monate unter dem Normalwert.



**Abb. 15: IgG Level nach allogener Transplantation (IgG in mg/dl), Monat 1 bis Monat 12 nach Transplantation, Matched URD, DUCBT**

Die Abbildung 16 beschreibt den Anteil der Patienten mit normwertigen IgG Werten im Verhältnis zur gesamten Gruppe. Es liegen für diese Untersuchung keine Vergleichsdaten der MUD Gruppe vor. Dieser Wert erlaubt es aber, eine Übersicht über die humorale Immunrekonstitution der DUCB Kohorte als Ganzes zu gewinnen. Bereits 7 Monate nach der Transplantation wurde bei mehr als der Hälfte der DUCB Patienten ein IgG Level oberhalb der unteren Normgrenze (700mg/dl) (Abb.16) gemessen. Diese Zahl ist nach 24 Monaten noch größer, da zu diesem Zeitpunkt >80% der überwachten Patienten einen normalisierten IgG Spiegel über 700mg/dl nachweisen können. Dies



verdeutlicht, dass die Rekonstitution des humoralen Immunsystems bei einer Mehrheit der DUCB Patienten erfolgreich verläuft.

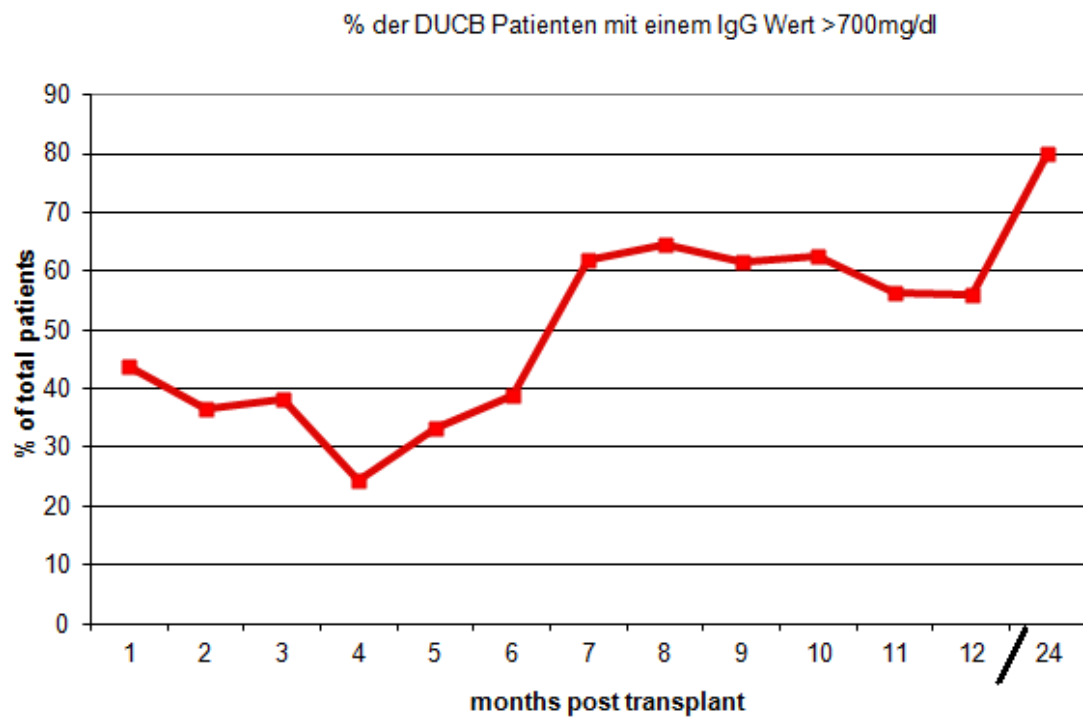


Abb. 16: relativer DUCB Patientenanteil mit einem IgG Level größer als die untere Normgrenze (>700mg/dl)

## **4. Diskussion**

### **4.1 Immunrekonstitution**

Das Hauptziel dieser Studie ist es, die Immunrekonstitution von 42 adulten Patienten nach Stammzelltransplantation aus Nabelschnurblut zu analysieren und die entscheidenden Faktoren der Immunrekonstitution zu definieren.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde eine weitere Kohorte von 102 Patienten rekrutiert, welche GCSF-mobilisierte periphere Stammzellen von HLA-gematchten unverwandten Spendern erhalten hatten. Beide Gruppen wurden einer nicht-myeloablativen Konditionierungs-Chemotherapie unterzogen.

Bei pädiatrischen Patienten wurden bereits phänotypische Differenzen in der Rekonstitution von Nabelschnurblut- und konventionellen Knochenmarkstammzellen beschrieben (De Lima 2001), das Ausmaß der Rekonstitution beim Erwachsenen hingegen ist bisher noch nicht hinreichend untersucht worden. Unsere Ergebnisse sind kompatibel mit bereits publizierten Daten aus der Literatur zur Nabelschnurbluttransplantation bei Kindern (Klein et al. 2001, Pavletic et al. 1998, Komanduri et al. 2007, Niehues et al. 2001, Moretta et al. 2001). Zunächst einmal fällt die Differenz in der Rekonstitution der T Zellen auf, die bei der DUCB Gruppe deutlich verzögert und mit einem signifikant erhöhten Infektionsrisiko in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation assoziiert ist. Dies mag verschiedene Gründe haben, von denen wir einige diskutieren wollen.

Die Unterschiede ergeben sich zunächst einmal aus der Konditionierung. Die Verwendung von Antithymoglobulin (ATG) im Rahmen der Konditionierung vor Transplantation soll eine stärkere Immunsuppression garantieren und damit zunächst das Abstoßen der HLA-gemismatchten DUCB Transplantate und später auch das Auftreten von akuter- und chronischer GvHD verhindern (Bacigalupo et al. 2005, Ballen 2009). Zugleich aber vertieft diese Vorbehandlung die Immunsuppression des Patienten, indem seine T Zellzahl vor der Transplantation deutlich sinkt. Gleichzeitig werden kurz nach der Transplantation auch Spender T Zellen angegriffen, was einen indirekten Effekt

einer GvHD Prophylaxe mit sich führt. In der Folge haben die DUCB Patienten in den ersten 3 Monaten nach der Transplantation sehr wenige zirkulierende T Zellen als Ausgangswert. Insofern könnte sowohl das Verwenden von ATG als auch die geringe Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen zu der deutlich verzögerten Erholung der T Zellen in der Zeit nach der Transplantation beitragen. Ein weiterer interessanter Ansatz könnte in der Existenz von speziellen T Zell Nischen im Rahmen der non-myeloablativen Konditionierung liegen, die eine selektive Expansion von peripheren T Zellen erlauben und die Differenzen in der frühen T Zell Erholung erklären (Chao et al. 2002).

Es muss betont werden, dass die MUD Gruppe eine 33x höhere Zellzahl an CD34+ hämatopoetischen Stammzellen erhielt als die DUCB Gruppe. Dies erklärt sich durch die niedrige Gesamtzellzahl in den Nabelschnurblutprodukten. In Anbetracht dieser Zellzahldifferenz lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Erholung der T Zellen aller Untergruppen beobachten, die in der MUD Gruppe früher und deutlicher auftritt. Zeitgleich kann man bei den B- und NK Zellen eine Erholung beobachten, die in der DUCB Kohorte früher und ausgeprägter ist als in der MUD Kohorte.

Es wurde gezeigt, dass die CD34+ hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblutprodukten eine höhere proliferative Kapazität besitzen als diejenigen, die mittels GCSF aus dem peripheren Blut Erwachsener gewonnen werden (Ng et al. 2004). Dies würde die vergleichbar starke Zellexpansion in der DUCB Gruppe erklären, lässt aber die Diskrepanz zwischen den T Zell und B- und NK Zell Reihen unbeantwortet. In der Vergangenheit hat es bereits mehrfach Versuche gegeben, höhere Stammzellzahlen durch eine ex-vivo Expansion der CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut zu erreichen (Jaroscak et al. 2003). In klinischen Versuchen haben sich diese vorbehandelten Zellen allerdings in ihrer Expansionsfähigkeit als unterlegen erwiesen und keinen Überlebensvorteil erzielt (De Lima et al. 2008).

In einigen *in vitro* Analysen wurden in der Vergangenheit die Charakteristika der Stammzellen aus Nabelschnurblut mit denen von adulten Spendern verglichen. Offenbar war die Anzahl der CD4\*CD45RA\* naiven T Zellen größer in den Nabelschnurblutproben (Gomi et al. 1997). Einige Autoren von

Übersichtsarbeiten bezeichnen dieses sogar als ein typisches Merkmal der T Zell Expression im Nabelschnurblut (Brown und Boussiotis 2008). Wir können diesen Eindruck auf der Basis der uns vorliegenden klinischen Daten allerdings nicht bestätigen. Bereits in den ersten Monaten nach der Transplantation ist die T Zell Expansion deutlich von den reifen CD4\*CD45RO\* memory T Zellen abhängig.

Obwohl Nabelschnurblutprodukte relativ wenig memory T Zellen enthalten, wird die frühe T Zell Rekonstitution nach DUCB Transplantation vor allem durch eine Thymus-unabhängige Expansion der peripher zirkulierenden reifen Spender T Zellen erreicht (Garderet et al. 1998; Mackall et al. 1996).

Die CD4 Helfer T Zellen beginnen nach 3 Monaten zu steigen, was vor allem auf den reifen memory CD4 T Zellen basiert (Abb. 7 naive CD4 T Zellen, Abb. 8 memory CD4 T Zellen). Die in der Folge wachsende T Zellzahl nach 6 Monaten besteht ebenfalls fast vollständig aus reifen CD4 T Zellen. Die naiven CD4 Zellen und die CD8 T Zellen sind im Blut der DUCB Patienten nur in sehr geringer Zahl nachweisbar. Es wurde bereits argumentiert, dass die Erholung der CD8 Zellen zwar verspätet, nicht aber funktionell eingeschränkt sei (Brown et al. 2007).

Klinisch scheint das Infektionsrisiko am Anfang am deutlichsten zu sein und sich trotz der verspäteten naiven CD4 und CD8 Erholung auf die ersten 100 Tage nach der Transplantation zu beschränken. Diese zunächst klinische Beobachtung lässt vermuten, dass die vorhandene massive Erholung der B Zell- und NK Zellreihe zusammen mit den vorhandenen CD4-memory Zellen ausreicht, um das Infektionsrisiko für den Patienten unter Kontrolle zu halten. Trotz einer insuffizienten naiven T Helferzellzahl ist folglich Immunität vorhanden, die sich über andere nicht T Zell abhängige Mechanismen manifestieren muss. Der Prozess der Immunrekonstitution scheint bei den DUCB und den MUD Patienten qualitativ unterschiedlich zu sein. Die Frage ist, durch welche Faktoren sich diese Immunität definiert und wie sie reguliert wird?

Aus der vorliegenden Analyse geht hervor, dass die Erholung der naiven CD4 T Zellen am deutlichsten von allen Zellarten eingeschränkt war. In den ersten 6 Monaten nach der Transplantation waren nur sehr wenige CD4CD45RO- naive

T Zellen nachweisbar. Im Gegensatz zu den reifen T Zellen, die sich auch peripher teilen können, müssen naive T Zellen durch eine Passage in der Mikroumgebung des Thymus in der Präsenz von hämatopoetischen Progenitorzellen reifen (Mackall et al. 1996; Komanduri et al. 2007a). Trotz ihrer kleinen Zahl lassen sich naive CD4 T Zellen in der MUD Kohorte bereits einen Monat nach Transplantation nachweisen. Die Daten zur Expansion der naiven CD4 T Zellen in der MUD Kohorte zeigen, dass sich die Thymopoese nach einer nicht-myeloablativen Konditionierung bereits relativ schnell erholen kann und dass das hohe Alter der Patienten (Altersmedian der MUD Kohorte: Tabelle 1) keinen entscheidenden Nachteil in der Thymopoese belegt. In vorausgegangenen Studien wurde bei pädiatrischen Patienten eine effiziente Thymopoese bei Kindern beobachtet (Niehues et al. 2001). Neben der verminderten Stammzellzahl/Kg Körpergewicht galt der Funktionsverlust des Thymus bei Erwachsenen als ein Hindernis für die DUCBT.

Wie bereits erwähnt, ist die Zahl an hämatopoetischen CD34+ Stammzellen/kg Körpergewicht bei der DUCB Kohorte deutlich niedriger, was auch die verzögerte Erholung der naiven T Zellen erklären könnte. Dieser Faktor ist besonders relevant im historischen Vergleich zu pädiatrischen Patientenkohorten, bei denen die T Zell Erholung auch nach Nabelschnurbluttransplantation gewährleistet ist und unter anderem im Verhältnis vom geringen Körpergewicht zur Stammzelldosis begründet wurde. Vorausgegangene Studien haben eine Mindestzellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/Kg Körpergewicht etabliert, um eine erfolgreiche Stammzelltransplantation mit Nabelschnurblut zu garantieren (Gluckman 2001).

Obwohl in dieser Studie kein direkter Vergleich zwischen der Transplantation von einem (UCB) und zwei (DUCB) Nabelschnurblutprodukten durchgeführt wurde, scheint dieser Unterschied im Vergleich nicht die T Zell Erholung zu verbessern (Barker et al. 2005). Wir haben bei unseren DUCB Patienten in der Chimerismusanalyse vermehrt eine frühe Konversion zu einem dominanten Chimerismus eines Nabelschnurblutproduktes beobachtet, die bei 67% der Patienten in den ersten 3 Monaten erfolgte (Abb. 3). Dabei lassen sich die Zellen des anderen Spenders bei einer 100% Dominanz nicht mehr nachweisen und man geht davon aus, dass alle Immunzellen aus den Stammzellen eines

einzelnen Spenders entstehen. Wir glauben, dass dieser Monochimerismus den Pool der verfügbaren T Zellen einschränkt und mitunter für die langsame T Zell Erholung verantwortlich sein könnte.

Im Gegensatz zu den T Zellen erleben die B- und NK Zellen eine rasche Erholung in der DUCB Kohorte. Da die IgG und IgM Level sich parallel zu der B Zellzahl erholen (Abb. 15/16, Abb. 11), ist davon auszugehen, dass es sich bei den neu entstandenen B Zellen um funktional aktive B Zellen handelt. Die zugrunde liegenden Faktoren der B- und NK Zellerholung sind bislang unbekannt und könnten in der schweren Lymphopenie der T Zellen der DUCB Patientengruppe begründet liegen, welche alternativ kompensiert wird. Es wurde gezeigt, dass bei Kindern die Erholung der NK Zellen nach DUCBT frühzeitig erfolgt und diese Zellen ihre zytotoxische Aktivität funktionell wahrnehmen können (Brahmi et al. 2001).

Die Erholung der Lymphozyten bei einer Lymphopenie wird in erster Linie durch homöostatische Zytokine wie IL7, IL15 und BAFF (B-cell activating factor BAFF) geregelt (Komanduri et al. 2007, Merindol et al. 2011, Sarantopoulos et al. 2009). Letzterer Signalfaktor scheint bei der B Zell Erholung nach Myeloablation eine entscheidende Rolle zu spielen (Gorelik et al. 2003). BAFF gehört zur Familie der Tumor Nekrosefaktoren (TNF) und erlaubt unter normalen Bedingungen das Überleben von nicht auto-reaktiven transitionellen B Zellen, indem deren Apoptose verhindert wird (Khan 2009). Es wurde kürzlich gezeigt, dass die BAFF Serumlevel in den ersten Monaten nach einer Nabelschnurbluttransplantation deutlich erhöht waren (Jacobson, Turki et al. 2011).

Die Rolle der CD3+CD56+ NKT Zellen ist in der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation in vorausgegangenen Studien bisher nicht genauer beleuchtet worden. Diese Zellgruppe hat zytolytische Funktionen der NK Zellen und exprimiert zugleich CD3 und  $\alpha\beta$ -T-Zellmarker (Schmidt et al. 1986). Obwohl sich die konventionellen NK Zellen in der DUCB Kohorte rasch erholen, bleibt diese Erholung bei den NKT Zellen aus. Dies könnte sich durch die geringe Anzahl von reifen NKT Zellen im Nabelschnurblutprodukt erklären

lassen (Theilgaard-Monch et al. 2001), mag aber auch an weiteren bislang unbekannten Faktoren liegen.

Bei unserer Betrachtung der beiden Patientenkohorten ergab sich ein weiterer Unterschied bezüglich der Dendritischen Zellen (DCs). Es gab Differenzen bei den plasmazytoiden- (CD123+) nicht aber bei den myeloiden (CD11c) Dendritischen Zellen, wobei letztere nach 12 Monaten in der DUCB Kohorte vermehrt auftraten. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Dendritische Zellen aus Nabelschnurblut sich phänotypisch von den klassischen peripher gewonnen Zellen unterscheiden. Sie sind unreif und stimulieren allogene T Zellen nur schwach, was zu einer Dominanz der Th2 Helfer Zellen Stimulation führt (Naderi et al. 2009). Die unterschiedliche proportionale Verteilung der DC Zelltypen und deren unreifer Phänotyp könnte auch teilweise die niedrigere GvHD Inzidenz in der DUCB Gruppe erklären.

## **4.2 GVHD**

Da das Auftreten einer GvHD die Morbidität und die Mortalität der Patienten entscheidend beeinflusst, kommt diesem klinischen Parameter regelmäßig eine große Bedeutung zu. Wie bei dem OS und dem PFS konnte auch kein Unterschied bezüglich der aGvHD zwischen den beiden Kohorten beobachtet werden. Hingegen war in der DUCB Gruppe die Rate der cGvHD im Vergleich zur MUD Gruppe vermindert, obwohl die DUCB Gruppe HLA-teil-gemismatchte Transplantate erhalten hatte (bis zu 3/6 HLA Allele). Es gibt eine Reihe möglicher Begründungen für diesen Unterschied in der cGvHD Rate, die auf die unterschiedlichen Mechanismen des Chimerismus und der Immunrekonstitution zurückzuführen sind. Zunächst einmal scheint das Mismatch im Kontext einer Nabelschnurbluttransplantation eine andere Bedeutung als im Rahmen adulter Spender zu haben. Dies könnte auch an der raschen Konversion zu einem dominanten Chimerismus liegen, welche bei der Mehrheit der DUCB Patienten beobachtet wurde. Zudem ist, wie bereits vorher erwähnt, die T Zell Erholung in der DUCB Kohorte deutlich eingeschränkt. T Zell assoziierte Mechanismen gelten als treibende Kraft in der Entstehung einer GvHD. Klinisch wurde dies über eine deutlich verminderte GvHD Inzidenz bei T Zell depletierten

Stammzellprodukten gezeigt (Papadopoulos et al. 1998). Zudem könnte die frühe Erholung der NK Zellen und der B Zellen über regulatorische Mechanismen zu einer verminderten cGvHD Inzidenz beitragen. Die in dieser Studie beobachtete verminderte Inzidenz chronischer GvHD (cGvHD) in der DUCB Gruppe ist konsistent mit bereits veröffentlichten Daten (Laughlin et al. 2004; Rocha et al. 2004).

### **4.3 Immunoregulatorische Komponenten: Tregs, Bregs und NK Zellen**

Immunoregulatorischen Mechanismen wird eine große Bedeutung in der allgemeinen Immunregulation zugesprochen. Zunächst wurden diese bei T Zell- (Shevach 2000) und später auch bei B Zellsubpopulationen (Mizoguchi und Bhan 2006) beschrieben. Regulatorische Zellen interferieren mit der Effizienz der Antigenpräsentation und schränken die T Zell Effektorfunktion ein (Steinman et al. 2003; DiLillo et al. 2010b), was sich bei Vakzinationsmodellen als nachteilig erweist. Auf der anderen Seite wurden diese regulatorischen Mechanismen mit einer verminderten Inzidenz von Autoimmunerkrankungen assoziiert (Greenwald et al. 2005; Shevach 2000; Matsushita et al. 2010). Die Diskussion der Regulationsmechanismen im Rahmen der Signaltransduktion gehört nicht zur Fragestellung dieser Arbeit.

#### **4.3.1.Tregs**

Eine genauere Betrachtung der Untergruppen der T Zellreihe zeigt einen signifikanten Unterschied in der Erholung der regulatorischen T Zellen (Tregs) auf. Trotz bereits veröffentlichter Studien, in denen auf die große Zahl der CD4CD25 Tregs im Nabelschnurblut hingewiesen wurde, deren Funktion zudem auch ausgeprägter sein soll als die jener Tregs aus peripherem Blut (Godfrey et al. 2005, Wing et al. 2002, Lee et al. 2009), ist die Erholung der Tregs in der DUCB Kohorte in den ersten 6 Monaten dieser Studie verzögert (Abb. 9). Die verminderte Treg Zahl korreliert mit der allgemeinen T Zell Suppression in der DUCB. In einer anderen Studie konnte, allerdings bei voller myeloablativer Konditionierung, gezeigt werden, dass die Expansion der Tregs



bei diesen Patienten in erster Linie auf eine Gruppe von reifen memory Tregs zurückzuführen war (Matsuoka et al. 2010), was eine unterschiedliche T Zell Homeostase nach der Transplantation belegt. Auch in unserer Studie spiegeln die Tregs in beiden Patientenkohorten (DUCB und MUD) die Entwicklung der reifen CD4CD45RO<sup>+</sup> memory T Zellen wider und entwickeln sich analog.

Klinisch fällt allerdings auf, dass die verminderte Treg Rekonstitution nicht mit höheren GvHD Raten assoziiert ist (Tabelle 2). Die cGvHD Rate fällt in der DUCB Kohorte sogar deutlich geringer aus (10% DUCB vs. 55% MUD). Eine mögliche Erklärung liegt in der beobachteten allgemeinen T Zellsuppression, die neben den Tregs auch die Effektor-T-Zellen erfasst. Die Rekonstitution der CD8 Zellen ist in der DUCB Kohorte verzögert (Abb. 6). In weiteren Studien sollte zudem geklärt werden, ob sich in der B Zell Fraktion der DUCB Kohorten vermehrt regulatorische B Zellen nachweisen lassen.

In unserer Studie wurde ausschließlich die CD4CD25 Treg Population gemessen und in der DUCB Kohorte vermindert vorgefunden. Eine Bestimmung des intrazellulären FoxP3 erfolgte aus technischen Gründen nicht bei diesen Zellen. Letztere Methode gilt inzwischen als Standard in der Beschreibung von regulatorischen T Zellen (Godfrey et al. 2005), erfordert allerdings eine intrazelluläre Färbung der Treg Population und eine separate FACS Analyse. Es ist im Rahmen dieser Studie auch keine weitere Durchflusszytometrische Charakterisierung nach neuesten B Zell Oberflächenmarkern zur Identifikation von Bregs erfolgt, welche allerdings erst nach Abschluss der experimentellen Phase publiziert wurden.

#### **4.3.2 Bregs**

Mit einer Bezugnahme auf die neueste Beschreibung von Markern für regulatorische B Zellen (Bregs) in der Maus und im Menschen könnte sich eine vertiefende Aufklärung der zugrundeliegenden immunmodulatorischen Mechanismen verbinden. Die Dominanz der B Zell Fraktion im Rahmen der Immunrekonstitution erfordert eine Subgruppenanalyse.

Zunächst wurde im Mausmodell eine Subgruppe der B Zellen, genannt B10 Zellen, identifiziert, die IL10 sezernieren und eine regulatorische Aktivität

aufweisen (Yanaba et al. 2009). Diese Zellfraktion ist bei Mäusen mit Autoimmunerkrankungen vermindert nachgewiesen worden (DiLillo et al. 2010b) und dabei wurde ihre zentrale Rolle in der Regulation der Autoimmunenzephalitis (EAE), einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, herausgestellt.

Kürzlich wurden regulatorische B Zellen (Bregs) auch im Menschen identifiziert und als kleine Subpopulation mit den Oberflächenmarkern CD19+CD24hiCD27+ charakterisiert (DiLillo et al. 2010b). Ihr relativer Anteil scheint im Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis (RA), Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) und Multipler Sklerose erhöht zu sein. Eine weitere Arbeitsgruppe hatte IL10 sezernierende regulatorische B Zellen beim Menschen vermehrt in der CD19\*CD24hiCD38hi Subpopulation (Blair et al. 2010) beschrieben. Die Debatte zur Rolle der regulatorischen B Zellen und der beteiligten Zellmarker ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Es wäre ebenfalls interessant, zukünftig zu untersuchen, ob die Patienten nach einer Nabelschnurbluttransplantation vermehrt reife CD19+ CD38+ Plasmazellen bilden. Weitere Studien werden zur Klärung der B Zell Subtypen bei dieser Patientengruppe benötigt.

#### **4.3.3 NK Zellen**

Die Fraktion der NK Zellen ist eine weitere dominante Zellpopulation in der DUCB Kohorte. Dieses Ergebnis wurde in ähnlicher Form auch bei pädiatrischen Patienten beobachtet (Merindol et al. 2011). In der Abwesenheit von Effektor T Zellen bei diesen Patienten stellt sich die Frage, ob die Kontrolle der Neoplasie, die klinisch durch das vergleichbare PFS belegt wurde, durch die Aktivität der NK Zellen bedingt wird. Die hohe NK Zellzahl legt nahe, dass bei der DUCB Kohorte effektorische Mechanismen durch NK Zellen kompensiert werden. Es wurde in Mausmodellen gezeigt, dass NK Zellen neben ihrer zytolytischen Antitumorwirkung auch eine immunoregulatorische Komponente aufweisen, indem sie autoreaktive T Zellen erkennen und lysieren können (Rabinovich et al. 2003). Aufgrund des deutlich vermehrten Auftretens der NK Zellen im Rahmen der Immunrekonstitution der DUCB Patienten wäre

es von besonderer Bedeutung, die regulatorische Rolle dieser Zellart genauer zu untersuchen.

#### **4.4 Antitumoreffekte der B Zellen**

Bezüglich des Antitumoreffekts der B Zellen ist die Datenlage bislang noch uneinheitlich. Auf der einen Seite wird die Sekretion von großen Mengen an IL10 und TGF $\beta$  mit einer Verminderung der antitumorösen Aktivität assoziiert. So wurde in einer Studie die Verlangsamung des Tumorwachstums und der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom, nach B Zell Depletion mittels des CD20 Antikörpers Rituximab, beschrieben (Barbera-Guillem et al. 2000). Eine Folgestudie beim Nierenzellkarzinom und beim Melanom konnte hingegen keinen signifikanten Unterschied zeigen (Aklilu et al. 2004). In einer weiteren Studie wurde mittels Rituximab eine kleine Subpopulation beim Melanom eliminiert, was zu einer deutlichen Regression des Resttumors führte (Schmidt et al. 2011). Dagegen hatte eine andere Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine therapeutische Depletion der B Zellen mittels Rituximab das Wachstum des B16 Melanoms sogar förderte und mit der T Zell Induktion interferierte (DiLillo et al. 2010a).

#### **4.5 Qualitative Unterschiede in der Immunrekonstitution**

Es lässt sich festhalten, dass sich die Immunrekonstitution bei den beiden untersuchten Patientenkohorten sowohl quantitativ als auch qualitativ unterscheidet<sup>1</sup>. Auf der einen Seite beobachten wir offensichtliche numerische Unterschiede zwischen beiden Gruppen, die allerdings auf den zweiten Blick ein völlig unterschiedliches Muster der Immunrekonstitution offenbaren. Die

---

<sup>1</sup> Die Definition einer Krankheitsnorm kann sowohl auf quantitativer als auch auf qualitativer Ebene erfolgen. Die Quantitative Definition hat ihren Ursprung in den Werken von Claude Bernard zur experimentellen Medizin (*Introduction to the study of experimental medicine*, Dover, 1959). In jüngeren Werken wird die Frage der „Quantification of Norms“ in den Arbeiten von Christopher Boorse und auch bei Anne Fagault-Largeault diskutiert. Die qualitative Definition einer Norm wurde durch Georges Canguilhem entwickelt. In seinen Werk *The Normal and the Pathological* (Dordrecht, 1979), erarbeitet Canguilhem die medizinische Norm als eine qualitative Entität, die wenn auch in quantitativer Form auftretend, ihre Begründung in ihrer Qualität als Norm findet. Auf der Ebene des Organismus grenzt sich das Normale vom Pathologischen daher nicht durch eine reine numerische Abgrenzung ab, sondern ist als ein qualitativ unterschiedlicher Prozess, der sich über seine Fähigkeit, aktiv neue Normen schaffen zu können, definiert. Eine Norm, v.a. eine medizinische Norm ist daher immer primär qualitativ begründet und leitet sich nicht von einer Quantität ab. Diese Eigenschaft neue Normen zu etablieren bezeichnet Canguilhem als „originelle Qualität des Lebenden“, und begründet darin die einzigartige Eigenschaft dieser qualitativen Norm, die als Antwort auf einen pathologischen Prozess entsteht.

Zellfraktionen sind im Rahmen der Immunrekonstitution derart unterschiedlich ausgeprägt, dass sich die Frage stellt, ob die Funktion des Immunsystems bei den beiden Patientengruppen unterschiedlich reguliert wird. Die Frage nach den generellen Mechanismen der Immunität stellt sich daher in diesem Kontext.

Die Patienten der DUCB Kohorte entwickeln nach der Stammzelltransplantation durch die Abwesenheit von T Zellen – vor allem T Helfer Zellen – eine temporäre Immunsuppression und eine Anfälligkeit für virale Infektionen. Dies spiegelt sich in der erhöhten Infektionsrate in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation wider. Dennoch ist die Anzahl an z.B. Pilzinfektionen, die bei anderen chronisch immunsupprimierten Patientengruppen ein lebensbedrohliches Risiko darstellen, nicht erhöht. Parallel lässt sich die massive Expansion der B Zelle und NK Zellefraktionen beobachten, welche die vorhandene Immunsuppression zu kompensieren scheint. Wir argumentieren hier, dass diese kompensatorischen Mechanismen der Immunregulation aktiv auf das vorhandene Defizit antworten und mit einem alternativen Schema der Immunrekonstitution diese Lücke zu beheben versuchen. In dieser Folge wird auch die Expansionskapazität der DUCB basierenden Stammzellen verdeutlicht. Im Gegensatz zu den peripher geernteten GCSF-mobilisierten Stammzellen ermöglichen sie eine deutliche Expansion der myeloiden Reihe, insbesondere der B Zellen und NK Zellen. Hingegen muss bezüglich der Expansionskapazität der DUCB Produkte eindeutig festgehalten werden, dass diese einen signifikanten Nachteil in Bezug auf die T Zelle Immunität mit sich bringen. Diese Einschränkung ist derart ausgeprägt, dass sie sich in deutlich höheren Infektionsraten manifestiert, die sich in einer erhöhten infektionsassoziierten Mortalität widerspiegeln.

Wir stellen abschließend die Hypothese auf, dass die Immunrekonstitution bei den DUCB- und bei den MUD-Patienten ein qualitativ unterschiedlicher Prozess, im Sinne Canguilhems, zu sein scheint, der anhand der Dominanz bestimmter Zellgruppen beschreiben lässt, welche jeweils eine funktionelle Norm etablieren. Dieser normative Prozess lässt sich auf ein klinisches Gesamtbild übertragen, welches entscheidend für die Statusevaluation des Patienten ist. Die Immunrekonstitution der Patienten, die Stammzellen aus Nabelschnurblut (DUCB) erhalten haben, ließe sich demnach als qualitativ

unterschiedlich zu derjenigen der Patienten bewerten, die mit adulten Stammzellen behandelt wurden (MUD). Unterschiedliche Zellfraktionen sind involviert und etablieren ein immunologisches Gleichgewicht (balance) auf unterschiedlichen Niveaus. Detaillierte Folgestudien zu dieser entscheidenden Frage der Systemimmunität wären wünschenswert, um zugrundeliegende regulatorische Maßnahmen zu identifizieren und mögliche Signalmechanismen zu charakterisieren.

Auch in Abwesenheit von Effektor T Zellen und deren verzögerter Rekonstitution wurde eine effiziente graft-versus Leukemia (GVL) Aktivität in der DUCB Kohorte erreicht, die sich in vergleichbaren OS und PFS Raten zeigte. Zwar konnte die Rolle der B Zellen und NK Zellen dabei aus den vorliegenden Daten nicht direkt bewiesen werden, es gibt aber durchaus Hinweise, die diese These stützen. Eine weitere Klärung der Aktivität dieser Zellgruppen sowohl im Hinblick auf deren regulatorische Funktion als auch auf ihre Effektorfunktion bleibt eine spannende Frage.

#### **4.6 Klinische Relevanz der Immunrekonstitution**

Eine Arbeit mit translationaler Fragestellung wirft die Frage nach der klinischen Relevanz der vorliegenden Ergebnisse und nach möglichen Applikationsfeldern auf. Wie bereits in der Einleitung herausgestellt wurde, bleibt die allogene Stammzelltransplantation in der klinischen Praxis, trotz der Fortschritte der vergangenen Jahre, mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden. Sowohl die eingeschränkte Infektabwehr als auch das Auftreten der GvHD nach der allogenen Transplantation stellen wesentliche Risiken in der Behandlung dar. Ein besseres Verständnis eines essentiellen Einflussfaktors auf das Gesamtüberleben, nämlich der Immunrekonstitution, ist daher natürlicherweise von klinischer Bedeutung.

Die hohe Inzidenz von Infektionen ist eine der Kernfragen, die auch in dieser vorliegenden Arbeit beleuchtet werden soll. Das entscheidende Ergebnis liegt hier allerdings in der Feststellung, dass zwei qualitativ unterschiedliche Arten der Immunrekonstitution, basierend auf unterschiedlichen Zellfraktionen, sich in

einem paradoxerweise gleichbleibenden OS und PFS spiegeln. In der Vergangenheit ist der Rekonstitution der T Zell Fraktion, neben derjenigen der neutrophilen Granulozyten, die Hauptaufmerksamkeit in der Bewertung der Immunrekonstitution geschenkt worden (Brown et al. 2010). Letztere galt als entscheidend in Fragen des Gesamtüberlebens aber auch bei der Kontrolle der GvHD. So führten T Zell depletierte Stammzellpräparate in der allogenen Transplantation zwar zu niedrigeren GvHD Raten, erhöhten aber das Rezidivrisiko für die Grunderkrankung (Goldman et al. 1988). Sicherlich spielen auch bei unserer Arbeit die T Lymphozyten eine Schlüsselrolle in der Kontrolle von Infektionen, was sich in der erhöhten Infektinzidenz der ersten 100 Tage in der DUCB Gruppe zeigt. Dieser temporäre Effekt korreliert allerdings nicht streng mit der T Zellzahl. Ein Anstieg der B- und NK Zellfraktionen scheint gleichstark mit der Infektrate assoziiert zu sein, was das ausgeglichene OS zwischen den beiden Patientenkohorten erklären könnte.

Unsere Daten zeigen, dass der Rekonstitution der B-Zell und NK-Zellfraktionen eine, bisher in der Literatur unterschätzte, Bedeutung in der Beeinflussung des OS und PFS zukommt. Auf Basis der vorliegenden Daten scheinen die vermeintlichen ‚Nachteile‘ der DUCB Gruppe in der T Zell Rekonstitution durch ‚Vorteile‘ in der B Zell und NK Zell Rekonstitution nivelliert zu werden. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse ist zurzeit noch nicht vollständig abzusehen, es besteht aber die Möglichkeit, dass sie weite Bereiche der Stammzelltransplantation verändern könnten.

Insbesondere die Rolle der regulatorischen B Zellen in der Transplantation und im Verständnis der GvHD bedarf einer besseren Klärung. Ihr möglicher Einfluss könnte sich aber auf der Basis der vorliegenden Daten in der niedrigeren GvHD Inzidenz in der DUCB Gruppe widerspiegeln. Eine verbesserte Beeinflussung der Immunzellen steht auch im Vordergrund der medikamentösen Prävention und Behandlung von Komplikationen der Transplantation. Ein weitverbreitetes Immunsuppressivum nach allogener Transplantation, das Cyclosporin (CSA), interferiert in erster Linie mit der Aktivität der T Zellen (Leitner et al. 2011). Basierend auf der regulatorischen Rolle der B- und NK Zellen, eröffnet sich eine neue Perspektive über die medikamentöse Beeinflussung ihrer Signalwege. Letztere könnten durchaus zu einer besseren Kontrolle der GvHD führen und

neben neueren Calcineurin- und mTor-Inhibitoren einen relevanten klinischen Stellenwert in der allogenen Transplantation erlangen. Denn gerade bezüglich der cGvHD Inzidenz ergaben sich signifikante Vorteile in der DUCB Kohorte, die sich auch im Gesamtüberleben niederschlagen.

Neben der regulatorischen Komponente, die sich in einer besseren Kontrolle der GvHD Inzidenz widerspiegeln könnte, verdient das Verständnis der Immunrekonstitution in Bezug auf eine Reduktion der Infektinzidenz eine besondere Bedeutung. Zwar ist die Infektrate, wie bereits oben erwähnt wurde, in der DUCB Kohorte in den ersten 100 Tagen nach Transplantation erhöht, nicht aber im weiteren Verlauf unserer Beobachtungen. Zugleich ist die T Zell Erholung um 6 Monate verzögert und kann daher die verbesserte Infektkompetenz der DUCB Gruppe nicht ausschließlich erklären. Die Rolle der NK Zellen verdient in diesem Zusammenhang eine besondere Erwähnung, da deren Rekonstitution mit einer besseren Immunkompetenz einherzugehen scheint. Die Zusammenschau unserer Ergebnisse könnte zu einem besseren Verständnis des Infektrisikos im Rahmen der allogenen Transplantation führen und möglicherweise letzteres Risiko senken. Idealerweise könnte durch eine Beeinflussung bestimmter Zellfraktionen das immunologische Netzwerk gezielter gesteuert und dadurch Morbidität und Mortalität minimiert werden.

Neben dem besseren Verständnis der Mechanismen der Immunrekonstitution ergeben sich weitere klinische Vorteile aus den vorliegenden Daten. Die Nabelschnurbluttransplantation ist in Deutschland eine selten praktizierte Form der allogenen Transplantation. Historisch gesehen wurde diese Stammzellquelle als wenig vielversprechend angesehen, angesichts einer signifikanten Komplikationsrate, Mortalität und der im Gegensatz dazu guten Verfügbarkeit von passenden Familien oder Fremdspendern.

Infolge einer Verbesserung der Überlebensrate (identisches OS im Vergleich zur MUD Gruppe) stellt sich allerdings die Frage, ob die Nabelschnurbluttransplantation für Patientenkollektive mit seltenen HLA Merkmalen und folglich schlechter Spenderverfügbarkeit eine alternative Stammzellquelle darstellen sollte. Letzterer Patientengruppe, häufig mit einem diversen ethnischen Hintergrund, stand eine Transplantation in der

Vergangenheit bei eingeschränkter Spenderverfügbarkeit nicht in gleichem Maße offen. Diese Kohorte könnte einen Vorteil aus der erweiterten Spenderverfügbarkeit bei der DUCBT ziehen, daher von der Nabelschnurbluttransplantation nachhaltig profitieren.

Durch die Möglichkeit des mismatch bei der Nabelschnurbluttransplantation ließe sich in Stammzellbiobanken ein Transplantat für fast alle Variationen bereitstellen. Von einer schnellen Transplantatverfügbarkeit könnten in der Folge auch weitere Patientenkollektive profitieren, indem Transplantationen kurzfristig geplant werden könnten. Einzelne Krankenhäuser, wie das Brigham and Women's Hospital in Boston, haben bereits mit der Einrichtung eines derartigen Programms begonnen, welches eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Hämatologen und Gynäkologen voraussetzt. Ein Nachteil bei dieser Praxis des Biobankings stellen noch deutlich erhöhte Kosten für die Bereitstellung der Stammzellen dar, die zum Teil für einen Preis von \$25.000 bis \$50.000 von diversen privaten Biobanken vermarktet werden. Ebenfalls gehen höchste Ansprüche an biologische Reinheit und Zellviabilität mit strengen gesetzlichen Vorgaben in der Praxis einher.

Zusammenfassend lassen sich vielfältige klinische Bezüge aus den vorliegenden Daten herstellen, die einen erheblichen Einfluss auf die Praxis der allogenen Stammzelltransplantation haben könnten.



## 5. Zusammenfassung

Die Nabelschnurbluttransplantation hat sich in den letzten 2 Jahrzehnten von einem hochexperimentellen Ansatz zu einer Therapiealternative für Patienten ohne HLA (Human-Leukocyte-Antigen) identischen Spender entwickelt. In dieser Arbeit wurden die Unterschiede in der Immunrekonstitution zwischen einer DUCB (Double Umbilical-Cord-Blood) Kohorte von 42 Patienten, die Stammzellen aus Nabelschnurblut erhielten und einer MUD (Matched-Unrelated Donors) Kohorte von 102 Patienten, die periphere GCSF (Granulocyte Colony-stimulating-factor) -mobilisierte Stammzellen erhielten, prospektiv analysiert.

Obwohl in der DUCB Patientenkohorte eine verspätete T Zell Rekonstitution beobachtet werden konnte, die mit einer erhöhten Infektionsrate einherging, traten diese vor allem in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation auf. Verglichen mit der MUD Gruppe war die T Zellgesamterholung um 6 Monate verzögert. Dennoch konnten wir keinen Unterschied bezüglich der Rückfallrate, des progressfreien Überlebens (PFS) und des Gesamtüberlebens (OS) zwischen beiden Kohorten feststellen. Die B Zell- und die NK (Natural Killer) Zellerholung war in der DUCB Kohorte ausgeprägter und früher zu beobachten. In der DUCB Kohorte wurde eine signifikant niedrigere cGvHD (chronic Graft-versus-Host Disease) Rate beobachtet, wohingegen die aGvHD (acute Graft-versus-Host Disease) Rate zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufwies.

Diese Daten zeigen, dass die Immunrekonstitution in den beobachteten Kohorten über qualitativ unterschiedliche Prozesse erfolgt. Ein verbessertes Verständnis dieser Prozesse könnte einen entscheidenden Fortschritt in der Praxis der allogenen Stammzelltransplantation bewirken. Es wird deutlich, dass die allogene Transplantation mit Nabelschnurblutstammzellen trotz eines erhöhten Infektionsrisikos durch opportunistische Erreger eine ernstzunehmende Alternative darstellt. Die Mechanismen ihrer vielfältigen Vorzüge in der Immunrekonstitution sollten Gegenstand vertiefender Forschung werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aklilu, M., et al., Depletion of normal B cells with rituximab as an adjunct to IL-2 therapy for renal cell carcinoma and melanoma. *Annals of Oncology*, 2004. **15**(7): p. 1109-1114.
2. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant*. 2005. **35**(3): p. 225-31.
3. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, Attar E, Haspel R, Kao G, Liney D, Alyea E, Lee S, Cutler C, Ho V, Soiffer R, Antin JH. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;**13**(1): p. 82-9.
4. Ballen, K., *New trends in transplantation: the use of Thymoglobulin (R)*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2009. **5**(3): p. 351-355.
5. Barbera-Guillem, E., et al., B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2000. **48**(10): p. 541-549.
6. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003. **48**: p. 35-43.
7. Barker, J.N., et al., Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood*, 2003. **102**(5): p. 1915-1919.
8. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaille CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005.**105**: p. 1343-1347.
9. Blair, P.A., et al., CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010. **32**(1): p. 129-140.
10. Brahmi, Z., et al., NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Human Immunology*, 2001. **62**(8): p. 782-790.
11. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Culter C, Ballen K, McDonough S, Reynolds C, Herrera M, Liney D, Ho V, Kao G, Armand P, Koreth J, Alyea E, McAfee S, Attar E, Dey B, Spitzer T, Soiffer R, Ritz J, Antin JH, Boussiotis VA. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood* 2010.**115**: p. 4111-4119.
12. Brown, J., et al., Impaired immune reconstitution after cord blood transplantation in adults is associated with delayed recovery but not functional impairment of CD8(+)T cells. *Blood*, 2007. **110**(11): p. 1057.
13. Brown, J.A. and V.A. Boussiotis, Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical Immunology*, 2008. **127**(3): p. 286-297.
14. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, et al. Alternative donor transplantation: results of parallel phase II trials using HLA-mismatched

- related bone marrow or unrelated umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011 Apr 28 [Epub ahead of print].
15. Brunstein CG, Weisdorf DJ. Future of cord blood for oncology uses. *Bone Marrow Transplant*. 2009. **44**(10): p.699-707
  16. Canguilhem G, *The Normal and the Pathological*, Dordrecht, 1979
  17. Chao, N.J., et al., Nonmyeloablative regimen preserves "niches" allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2002. **8**(5): p. 249-256.
  18. Cutler, C. and K. Ballen, Reduced-intensity conditioning and umbilical cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplantation*, 2009. **44**(10): p. 667-671.
  19. De Lima, M., et al., Double Cord Blood Transplantation (CBT) with and without Ex-Vivo Expansion (EXP): A Randomized, Controlled Study. *Blood*, 2008. **112**(11): p. 63-63.
  20. De Lima, M., et al., Using two mismatched unrelated donor cord blood units for transplantation: Analysis of chimerism and immune reconstitution. *Blood*, 2001. **98**(11): p. 5308.
  21. DiLillo, D.J., K. Yanaba, and T.F. Tedder, B Cells Are Required for Optimal CD4(+) and CD8(+) T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. *Journal of Immunology*, 2010. **184**(7): p. 4006-4016.
  22. DiLillo, D.J., T. Matsushita, and T.F. Tedder, B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Year In Immunology*, 2010. **1183**: p. 38-57.
  23. Eapen, M., et al., Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncology*, 2010. **11**(7): p. 653-660.
  24. Garderet L, Dulphy N, Douay C, et al. The umbilical cord blood  $\alpha\beta$  T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naïve but completely formed repertoire. *Blood* 1998;**91**: p. 340-346.
  25. Gluckman E, Rocha V, Boyer A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;**337**: p. 373-381.
  26. Gluckman, E., et al., Hematopoietic recostitution in a patient with fanconis anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA identical sibling. *New England Journal of Medicine*, 1989. **321**(17): p. 1174-1178.
  27. Gluckman, E., Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(24): p. 1860-1861.
  28. Godfrey WR, Sponden DJ, Ying GG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005;**105**: p. 750-758.
  29. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*. 1988;**108**(6): p.806-14

30. Gomi, S., et al., A comparative analysis of the transplant potential of umbilical cord blood versus mobilized peripheral blood stem cells. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 1997. **64**(4): p. 307-13.
31. Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, et al. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med* 2003; **198**: p. 937-945.
32. Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 1988. **16**: p.1140-54.
33. Greenwald RJ, Freeman GJ, and Sharpe AH, THE B7 FAMILY REVISITED, *Annual Review of Immunology*, 2005. **23**: p.515-548
34. Inoue, H., et al., The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34(+) stem cell transplantation in children: Comparison with bone marrow transplantation. *International Journal of Hematology*, 2003. **77**(4): p. 399-407.
35. Jacobson CA, Turki AT, et al. Immune Reconstitution after Double Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation: Comparison with Unrelated Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Aug 26. [Epub ahead of print]
36. Jaroscak, J., et al., Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 5061-5067.
37. Khan WN. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* 2009. **183**: p. 3561-3567.
38. Klein AK, Patel DD, Gooding ME, Sempowski GD, Chen BJ, Liu C, Kurtzberg J, Haynes BF, Chao NJ. T-cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Bio Blood Marrow Transplant* 2001. **7**: p. 454-466.
39. Komanduri KV, St. John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, Bryan SG, Kaur I, Martin S, Wieder ED, Worth L, Cooper LJJ, Petropoulos D, Molldrem JJ, Champlin RE, Shpall EJ. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007. **110**: p.4543-4551.
40. Konuma, T., et al., Second myeloablative allogeneic stem cell transplantation (SCT) using cord blood for leukemia relapsed after initial allogeneic SCT. *Leukemia Research*, 2009. **33**(6): p. 840-842.
41. Laughlin, M.J., et al., Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(24): p. 1815-1822.
42. Laughlin, M.J., et al., Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2004. **351**(22): p. 2265-2275.
43. Laughlin, M.J., Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplantation*, 2001. **27**(1): p. 1-6.
44. Lee C-C, Lin S-J, Cheng P-J, et al. The regulatory function of umbilical cord blood CD4+CD25+ T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous interleukin (IL)-2 or IL-15. *Ped All Immunol* 2009. **20**: p.624-632.

45. Leitner J, Drobits K, Pickl WF, Majdic O, Zlabinger G, Steinberger P. The effects of Cyclosporine A and azathioprine on human T cells activated by different costimulatory signals. *Immunol Lett.* 2011 Oct 30; **140**(1-2):74-80
46. Li, L.Q., et al., CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3068-3073.
47. Long, G.D., et al., Transplantation of unrelated umbilical cord blood in adult patients. *Leukemia*, 2002. **16**(3): p. 23.
48. Long, G.D., et al., Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2003. **9**(12): p. 772-780.
49. Mackall CL, Bare CV, Granger LA et al. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 1996; **156**: p.4609-4616.
50. Madrigal JA, Cohen SBA, Gluckmen E, Charron DJ. Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? *Hum Immunol* 1997; **56**: p. 1-5.
51. Matsuoka K, Kim HT, McDonough S, et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2010; **120**: p. 1479-1493.
52. Matsushita, T., et al., Regulatory B Cells (B10 Cells) and Regulatory T Cells Have Independent Roles in Controlling Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Initiation and Late-Phase Immunopathogenesis. *Journal Of Immunology*, 2010. **185**(4): p. 2240-2252.
53. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leuk Biol* 2011. **90**: p. 1-12.
54. Mizoguchi, A. and A.K. Bhan, A case for regulatory B cells. *Journal Of Immunology*, 2006. **176**(2): p. 705-710.
55. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol* 2001; **29**: p.371-379.
56. Naderi N, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Moazzeni SM. Cord blood dendritic cells prevent the differentiation of naïve T-helper cells towards Th1 irrespective of their subtype. *Clin Exp Med* 2009. **9**: p. 29-36.
57. Ng, Y.Y., et al., Gene-expression profiling of CD34(+) cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004. **75**(2): p. 314-323.
58. National Institutes of Health (NIH), Clinical Trial Database 2011, <http://clinicaltrials.gov>
59. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, Chan KW, Porcher R, Michel G, Ortega JJ, Wernet P, Gobel U, Gluckman E, Locatelli F. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children – a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 2001; **113**: p. 42-48.
60. Ooi, J., Cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplantation*, 2009. **44**(10): p. 661-666.

61. Ooi, J., et al., Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with ALL. *Bone Marrow Transplantation*, 2009. **43**(6): p. 455-459.
62. Ooi, J., et al., Unrelated Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning in Adults with Acute Myelogenous Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008. **14**(12): p. 1341-1347.
63. Orsini E, Alyea EP, Chillemi A, Schlossman R, McLaughlin S, Canning C, Soiffer RJ, Anderson KC, Ritz J. Conversion to full donor chimerism following donor lymphocyte infusion is associated with disease response in patients with multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000; **6**(4): p.375-86
64. Papadopoulos EB, et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood*. 1998. **91**(3): p.1083-90.
65. Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, Bierman PJ, Vose JM, Warkentin PI, Gross TG, Nasrati K, Armitage JO, Kessinger A, Bishop MR. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplant for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1998. **21**: p. 33-41.
66. Pidala J, Djulbegovic B, Anasetti C, Kharfan-Dabaja M, Kumar A. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in first complete remission. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011. 5;(10)
67. Rabinovich BA, Li J, Shannon J, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* 2003.**170**: p.3572-3576.
68. Rizzieri, D.A., et al., Durable engraftment of mismatched unrelated cord blood following a non-myeloablative preparative regimen for adults. *Blood*, 2001. **98**(11): p. 777.
69. Rizzieri, D.A., et al., Partially matched, nonmyeloablative allogeneic transplantation: Clinical outcomes and immune reconstitution. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(6): p. 690-697.
70. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000.**342**: p.1846-1854.
71. Rocha, V., et al., Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 2962-2971.
72. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Ruutu T, de Lima M, Finke J, Frasson F, Gluckman E; Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group; Eurocord-Netcord Registry. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004 25.**351**(22): p.2276-85

73. Rubinstein, P., et al., Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, 1998. **339**(22): p. 1565-1577.
74. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2009.**113**: p. 3865-3874.
75. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2011.**117**: p. 2275-2283.
76. Schmidt P, Kopecky C, Hombach A, Zigrino P, Mauch C, Abken H. Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011.**108**(6): p. 2474-9
77. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, et al. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 1986.**164**: p. 351-356.
78. Shevach EM, Regulatory T Cells in Autoimmunity, *Annual Review of Immunology*. 18 (2000): p.423-449
79. Shpall, E., et al., Transplantation of cord blood expanded ex vivo with copper chelator. *Blood*, 2004. **104**(11): p. 982.
80. Soiffer, R., *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. 2nd ed. 2008, New York, Humana Press.
81. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review Of Immunology*, 2003. **21**: p. 685-711.
82. Takahashi, S., et al., Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 1322-1330.
83. Takahashi, S., et al., Posttransplantation engraftment and safety of cord blood transplantation with grafts containing relatively low cell doses in adults. *International Journal of Hematology*, 2006. **84**(4): p. 359-362.
84. Takahashi, S., et al., Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3813-3820.
85. Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001.**28**: p.1073-82.
86. Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 2004.**20**: p.785-798.
87. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahmi Z, Smith FO. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000.**96**: p.2703-2711.
88. Tomonari, A., et al., Blood eosinophilia after unrelated cord blood transplantation for adults. *Bone Marrow Transplantation*, 2008. **42**(1): p. 63-65.

89. Tomonari, A., et al., Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplantation*, 2007. **40**(6): p. 523-528.
90. Tse, W., K.D. Bunting, and M.J. Laughlin, New insights unto cord blood stem cell transplantation. *Current Opinion in Hematology*, 2008. **15**(4): p. 279-284.
91. van Heeckeren, W.J., et al., Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults. *British Journal of Haematology*, 2007. **139**: p. 464-474.
92. Wagner, J.E., et al., Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1611-1618.
93. Wheatley K, Gray R., Commentary: Mendelian randomization--an update on its use to evaluate allogeneic stem cell transplantation in leukaemia. *Int J Epidemiol*. 2004.**33**(1): p. 15-7.
94. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al. Characterization of human CD25+CD4+ T cells in thymus, cord, and adult blood. *Immunol* 2002.**106**: p. 190-199.
95. Yanaba, K., et al., The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *Journal Of Immunology*, 2009. **182**(12): p. 7459-7472.
96. Zittoun RA, Mandelli F, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med*. 1995. 26;**332**(4): p. 217-23



## 7. Anhang

### 7.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Eigenschaften der Patientenkohorten	22
Tabelle 2: Klinisches Outcome der Patientenkohorten	23
Tabelle 3: Immunologische Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe (in absoluten Zellen/ $\mu$ l)	23
Abb. 1: Kaplan Meier Kurve zum Gesamtüberleben (OS)	25
Abb. 2: Kaplan Meier Kurve zum Progressfreien Überleben (PFS)	26
Abb. 3: DUCB Leukocyten Chimerismus (Blau = Spender 1, Grün =Spender 2)	27
Abb. 4: Zahl der CD3 <sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut der Patienten (absolute Zellen/ $\mu$ l), Posttransplantations Follow-up über 24 Monate, p= Prä-Transplantationswert, DUCB in rot und MUD in blau.	29
Abb. 5: Zahl der CD4 <sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut der Patienten	30
Abb. 6: Zahl der CD8 <sup>+</sup> T Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	31
Abb. 7: Zahl der CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> naiven T Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	32
Abb. 8: Zahl der CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> memory T Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	33
Abb. 9: Zahl der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen (Treg) (absolute Zellen/ $\mu$ l)	34
Abb. 10: Zahl der CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> NKT Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	35
Abb. 11: Zahl der CD19 <sup>+</sup> B Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	36
Abb. 12: Zahl der CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> NK Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l)	37
Abb. 13: Zahl der CD11c <sup>+</sup> myeloiden Dendritischen Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l) 6 Monate, 12 Monate und 24 Monate nach Transplantation, DUCB: Kreise; MUD: Dreiecke	38
Abb. 14: Zahl der CD123 <sup>+</sup> plasmazytoiden Dendritischen Zellen (absolute Zellen/ $\mu$ l), 6 Monate, 12 Monate und 24 Monate nach Transplantation, DUCB: Kreise; MUD: Dreiecke	39

Abb. 15: IgG Level nach allogener Transplantation (IgG in mg/dl), Monat 1 bis 40  
 Monat 12 nach Transplantation, Matched URD, DUCBT

Abb. 16: relativer DUCB Patientenanteil mit einem IgG Level größer als die untere  
 Normgrenze (>700mg/dl) 41

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymocyte globulin
BAFF	B-cell activating factor
BM	Bone marrow
Breg	regulatorische B Zellen
Bu	busulfan
CB	Cord blood
CFU	Colony forming units
CLL/SLL/PLL	small lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch-myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplette Remission
CSF	Koloniestimulierender Faktor
DLI	donor lymphocyte infusion
DC	Dendritische Zellen
DKMS	deutsche Knochenmarkspenderdatei
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLAMSA	Fludarabine + high-dosis cytarabine + amsacrine
Flu	Fludarabine
G-CSF	Granulozyten-stimulierender-Faktor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GVL	graft versus leukemia
GVT	graft versus tumor
Gy	Gray
HD-AraC	High-dosis cytarabine
HL	Hodgkin's lymphoma
HLA	Human-Leukocyte-Antigen
HSV	Herpes Simplex Viren

HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
IP	Interstitielle Pneumonitis
IPS	Idiopathisches Pneumonie Syndrom
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LFS	Leukämie free survival
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiples Myelom
MMF	Mycophenolatmofetil
MRD	Minimal residual disease
MTX	methotrexate
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK	Natürliche Killer Zellen
NKT	Natural Killer T Cells
NDMP	National Marrow Donor Programme (USA)
NRM	non-relapse mortality
OS	Overall survival
PBSC	Peripheral blood stem cells
PCP	Pneumocystis carinii
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFS	progression-free survival
PTLD	Posttransplantationale Lymphoproliferative Disorder
RA	Refraktäre Anämie
RA	Rheumatoide Arthritis
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss
RAEB-T	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RR	Relapse Rate
sAML	Sekundäre AML
Siro	Sirolimus
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
STR	short tandem repeats
SSP	Sequenz-spezifische Oligonukleotid Primer
Tac	Tacrolimus
TBI	Total body irradiation
Tregs	regulatorische T Zellen
TNF	Tumor Nekrosefaktoren
TRM	Treatment related mortality
UCBT	umbilical cord blood transplantation
VOD	hepatische Veno-occlusive Erkrankung

### **7.3 Danksagung**

Viele Personen haben diese Promotionsarbeit erst möglich gemacht und in ihrem Verlauf auf verschiedene Art unterstützt. Mein Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. Novotny für die Annahme des Themas und die freundliche Unterstützung und Betreuung. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Jerome Ritz, der so freundlich war, mich in seinem Labor aufzunehmen und mir ein inspirierendes Umfeld und seine Unterstützung anzubieten. Ich danke auch besonders Sean McDonough, Isabel Herrera, Doreen Sese und Dr. Haesook Kim für Rat und Tat. Professor Joseph Antin und Professor Robert Soiffer haben mir die klinischen Aspekte der Cord Blood Transplantation im Rahmen meines Praktischen Jahres eröffnet.

Professor Claude Debru, Professor Jean Michon und Professor Philippe Meyer haben erst die Bedingungen für dieses Projekt in die Wege geleitet, ich bin ihnen zutiefst verbunden.

Zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner Familie, die mir mit geduldiger Unterstützung stets zur Seite stand.

## **7.4 Lebenslauf**

*Der Lebenslauf ist in der Onlineversion aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.*

Der Lebenslauf ist in der Onlineversion aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.